

**Beiträge zur Struktur und Funktion des kleinen Säuger-Streßproteins HSP25
unter besonderer Berücksichtigung der Wechselwirkung mit Actin**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Martin Wieske
geboren am 12.11.1963 in Leeden

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. J. Rabe

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Herrmann, Berlin
2. Prof. Dr. Matthias Gaestel, Halle
3. Prof. Dr. Joachim Behlke, Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 1998

Abstract

HSP25 is a member of the ubiquitous family of small heat shock proteins belonging to the big class of stress proteins. It is related to acquiring of cellular thermotolerance, can act as molecular chaperone, is able to inhibit polymerization of actin *in vitro* and can form high molecular weight complexes. In this thesis the isolation, structural and functional characterization of this protein as well as its abundance in different tissues of rats suffering on pathological forms of hypertension is analyzed:

- A method for rapid isolation of HSP25 out of Ehrlich-ascites-tumor (EAT) was established. From isolated HSP25 low and high molecular weight material could be obtained.
- Analysis of high molecular weight complexes by means of electron microscopy and analytical ultracentrifugation results in a structural model characterized by a cylindrical structure composed of four stacked rings each containing eight HSP25 monomers.
- High-molecular weight complexes of recombinant HSP25 are organized as compact globular structures. Electron microscopic investigations of different mutants and of *in vitro* phosphorylated HSP25 show a connection between phosphorylational status and supramolecular organization of the protein: the higher the degree of phosphorylation the smaller are the HSP35-complexes.
- By means of electron microscopy and fluorescence spectroscopy it could be shown that only native HSP25 from EAT but not recombinant HSP25 nor HSP25 mutants inhibit polymerization of actin. This is in agreement with recent results showing that only unphosphorylated native HSP25 monomers are active inhibitors of actin polymerization.
- Two HSP25 derived peptides could be identified as competent inhibitors of actin polymerization. This is the first experimental evidence for a specific interaction of HSP25 sequences with actin. This interaction is dependent on the phosphorylational status as confirmed by phosphorylated HSP25 peptides.
- Preliminary results with cellulose bound peptide libraries indicate an interaction of HSP25 with an exposed loop in actin domain IV, an area involved in actin-actin interactions.
- HSP25 is of medical relevance because of its increased synthesis in a bright variety of pathological processes. Investigations on different animal models of hypertension show an enhanced accumulation of HSP25 in the right ventricle.
- A model is presented summing up the structure-function relationships of HSP25.

Zusammenfassung

HSP25 ist ein Vertreter der ubiquitär verbreiteten kleinen Hitzeschockproteine, einer Familie innerhalb der großen Klasse der Streßproteine. Es ist an der Vermittlung von zellulärer Streßtoleranz beteiligt, besitzt Chaperoneigenschaften, hemmt die Actinpolymerisation *in vitro* und ist in der Lage, supramolekulare Komplexe auszubilden. Die hier vorgelegte Arbeit befaßte sich mit der Isolierung, der strukturellen und funktionellen Charakterisierung des Proteins und seinem Vorkommen in verschiedenen Geweben von Ratten mit pathologisch erhöhtem Blutdruck:

- Es wurde eine Methode zur schonenden Isolierung von HSP25 aus Ehrlich-Ascites-Tumor (EAT) etabliert. Daraus konnte niedrig- und hochmolekulares Material gewonnen werden.
- Unter Anwendung elektronenmikroskopischer und hydrodynamischer Methoden konnte für die hochmolekularen Komplexe des nativen HSP25 ein Strukturmodell abgeleitet werden. Es ist durch eine zylinderförmige Struktur aus vier gestapelten Ringen mit je acht HSP25-Monomeren charakterisiert.
- Hochmolekulare Komplexe des rekombinanten HSP25 liegen demgegenüber als kompakte globuläre Strukturen vor. Elektronenmikroskopische Analysen verschiedener Mutanten und von phosphoryliertem HSP25 zeigen, daß die HSP25-Komplexe mit zunehmender Phosphorylierung kleiner werden. Dies belegt einen Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungszustand des Proteins und seiner supramolekularen Organisation.
- Mittels Elektronenmikroskopie und Fluoreszenzspektroskopie konnte gezeigt werden, daß nur natives HSP25 aus EAT, aber nicht rekombinantes HSP25 oder HSP25-Mutanten die Actinpolymerisation hemmen. Dies bestätigt den Befund, daß nur unphosphorylierte native HSP25-Monomere für die Inhibierung der Actinpolymerisation verantwortlich sind.
- Es konnten zwei HSP25-Peptide identifiziert werden, die eine Hemmung der Actinpolymerisation auslösen. Damit konnte erstmals experimentell nachgewiesen werden, daß bestimmte Sequenzabschnitte von HSP25 eine spezifische Wechselwirkung mit Actin eingehen. Mit Hilfe phosphorylierter HSP25-Peptide konnte die Abhängigkeit dieser Reaktion vom Phosphorylierungszustand bestätigt werden.
- Vorläufige Ergebnisse mit Zellulose-gebundenen Peptid-Bibliotheken deuten auf eine Wechselwirkung von HSP25 mit einem exponierten Loop in Actin-Domäne IV hin, einem Bereich, der an Actin-Actin-Wechselwirkungen beteiligt ist.
- HSP25 hat aufgrund seiner verstärkten Synthese bei vielen pathologischen Prozessen eine medizinische Relevanz. Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen zeigen, daß es bei Hypertonie-belasteten Herzen verstärkt im rechten Ventrikel akkumuliert wird.
- Es wird ein Modell vorgestellt, in dem die Struktur-Funktions-Beziehungen für HSP25 zusammengefaßt sind.

Für Birgit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziel der Arbeit.....	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Isolierung von HSP25 aus EAT	11
2.1.1	Zellaufschluß	11
2.1.2	Ammoniumsulfatfällung.....	11
2.1.3	DEAE-Cellulose-Säule.....	12
2.1.4	Hydroxylapatit-Säule	12
2.1.5	Mono Q-Säule	12
2.1.6	Isolierung und Fraktionierung von HSP25-Spezies	12
2.2	HSP25-Expression in E.coli, Isolierung und in vitro-Phosphorylierung	13
2.3	Actin-Präparation und -Markierung	13
2.3.1	Präparation von Actin.....	13
2.3.2	Präparation von Fluoreszenz-markiertem Actin	14
2.3.3	Präparation von Actin-Keimen	15
2.4	Bestimmung des HSP25- und HSP70-Gehaltes in Gewebeproben	15
2.4.1	Gewebeaufarbeitung.....	15
2.4.2	Quantifizierung	16
2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	17
2.6	Western-Blot.....	18
2.7	Elektronenmikroskopie.....	18
2.7.1	Negativkontrastierung	19
2.7.2	Bildverarbeitung.....	19
2.7.2.1	Digitalisierung der Negative.....	19
2.7.2.2	Strukturanalyse	19
2.7.2.3	Partikelgrößenanalyse	20
2.8	Hydrodynamische Methoden	20
2.9	Fluoreszenzspektroskopie	22
2.10	Peptid-Synthese	23
2.11	Peptid-Epitop-Scanning.....	23
2.12	Sequenzdaten	24

3 Ergebnisse	25
3.1 Isolierung von HSP25.....	25
3.2 Struktur von HSP25	28
3.2.1 Natives HSP25	28
3.2.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	28
3.2.1.2 Hydrodynamische Untersuchungen	29
3.2.1.3 Ableitung eines Strukturmodells für natives HSP25	31
3.2.2 Rekombinantes HSP25 und HSP25-Mutanten	32
3.2.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	33
3.2.2.2 Statistische Analyse der Partikelgrößen	34
3.3 Wechselwirkung von kHSPs mit Actin.....	37
3.3.1 Hemmung der Actinpolymerisation durch kHSPs und HSP25-Mutanten	37
3.3.2 Hemmung der Actinpolymerisation durch Peptide von kHSPs	38
3.3.3 Hydrodynamische Parameter von Actin und HSP25-Peptiden	45
3.3.4 Peptid-Epitop-Scanning von HSP25 und Actin.....	47
3.4 HSP25- und HSP70-Gehalt in Organen normotoner und hypertoner Ratten	48
3.4.1 Spontan hypertensive Ratten	48
3.4.2 Goldblatt-operierte Ratten	50
3.4.3 Transgene Ratten mit zusätzlichem Renin-Gen.....	53
4 Diskussion	56
4.1 Isolierung und strukturelle Charakterisierung von HSP25	56
4.2 Hemmung der Actinpolymerisation durch HSP25 und kHSP-Peptide	61
4.3 Vorkommen von HSP25 und HSP70 bei Hypertonie	66
4.4 Modell der Struktur-Funktionsbeziehungen von HSP25	68
5 Zusammenfassung	73
6 Literaturverzeichnis	76
7 Anhang	90
7.1 Abbildungsverzeichnis	90
7.2 Tabellenverzeichnis	90
7.3 Abkürzungen.....	91
7.4 Eigene Veröffentlichungen	94
7.5 Danksagung.....	95
7.6 Erklärung	96
7.7 Lebenslauf.....	97

1 Einleitung

Als Antwort auf eine Reihe von Störfaktoren reagieren Zellen mit der Umstellung ihres Stoffwechsels von der Synthese der Haushaltsproteine zur verstärkten Synthese von sogenannten Streßproteinen. Die ersten dieser Proteine wurden aufgrund ihrer spezifischen Expression nach Hitzeschock entdeckt und wurden deshalb Hitzeschockproteine (*heat shock proteins*, HSPs) genannt (Tissieres *et al.*, 1974). Die Induktion der HSPs konnte in allen bisher untersuchten Organismen nachgewiesen werden, was für die universelle Bedeutung dieser Proteine bei der Reaktion von Zellen auf Streß spricht. Zu den Faktoren, die die Synthese von HSPs auslösen können, zählen neben dem Hitzeschock auch chemische Substanzen wie z.B. Arsenit, Ethanol oder Schwermetalle, physikalische Reize wie Druck und UV-Licht oder physiologischer Streß, wie er etwa bei Erkrankungen des Organismus durch Infektionen, Anoxie oder Ischämie verursacht wird (Hightower, 1991). Die Einteilung der Hitzeschockproteine erfolgt im allgemeinen nach ihren in der SDS-Elektrophorese ermittelten Molekulargewichten, und man unterteilt sie demnach in die Proteine der HSP110-, HSP90-, HSP70-, HSP60-, HSP40, HSP20- und HSP8.5-Familien, deren Mitglieder in den meisten Fällen im Laufe der Evolution stark konserviert blieben. Die Proteine der HSP20-Familie werden auch kleine Hitzeschockproteine genannt.

Ein Beleg für die Bedeutung der HSPs für den Zellstoffwechsel unter suboptimalen Bedingungen ist das Phänomen der erworbenen Thermotoleranz. Darunter versteht man die Fähigkeit von Zellen, durch die temporäre Synthese von HSPs nach einem milden Hitzeschock (bei etwa 5°C über der Normaltemperatur) einen nachfolgenden stärkeren und normalerweise tödlichen Hitzeschock (bei etwa 10°C über der Normaltemperatur) zu überleben. Die Bedeutung der HSPs für die Thermotoleranz bestätigen Transfektionsexperimente. So wurden z.B. Hamster- und Maus-Zellen, die nach einer Transfektion HSP25 überexprimierten, resistent gegen einen sonst letalen Hitzeschock (Landry *et al.*, 1989). Ähnliches wurde für die HSPs mit 70 kDa und 104 kDa Molekulargewicht nachgewiesen (Li *et al.*, 1991; Sanchez und Lindquist, 1990; Sanchez *et al.*, 1992). Umgekehrt führte die kompetitive Hemmung der HSP70-Genaktivierung oder die Mikroinjektion von anti-HSP70-Antikörpern zu einer erhöhten Thermosensitivität bei Fibroblasten-Zellen (Johnston und Kucey, 1988; Riabowol *et al.*, 1988).

Was passiert auf zellulärer Ebene bei Streß und wodurch kommt es zu dem protektiven Effekt der Hitzeschockproteine? Unter Streßbedingungen, z.B. bei einem Hitzeschock, kommt es zu einer verstärkten Ansammlung von denaturierten, also falsch gefalteten und inaktiven Proteinen (Hightower, 1980). Werden sehr viele der zelleigenen Proteine in dieser Weise geschädigt, kann die Zelle lebenswichtige Stoffwechselleistungen nicht mehr erbringen. Die Folgen sind irreparable Schäden, die letztendlich zum Absterben der Zelle führen. Daß es derartige Probleme bei der Faltung von Proteinen *in vivo* tatsächlich gibt, wurde mit der Entwicklung der Überexpressions-Technik deutlich, denn viele Proteine, die in einem prokaryontischem Gast-Organismus überexprimiert wurden, enden als große, unlösliche Protein-Aggregate in

sogenannten '*inclusion bodies*' (Rudolph und Lilie, 1996). Von Gragerov *et al.* (1991; 1996) wurde die Bildung von *inclusion bodies* bei einer *E. coli*-Mutante mit einem Defekt in der Hitzeschockantwort beschrieben, was auf eine wichtige Rolle der Hitzeschockproteine bei der Verhinderung von intrazellulärer Proteinaggregation hindeutet. Dies bestätigen die Versuche von Goloubinoff *et al.* (1989), die zeigen konnten, daß die gleichzeitige Überexpression eines Wirts-HSPs und eines rekombinanten Proteins die Bildung von *inclusion bodies* verhindern kann.

Umfangreiche Untersuchungen der letzten Jahrzehnte belegen, daß HSPs nicht nur unter Streßbedingungen, sondern auch im normalen Zellstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen (zusammenfassende Darstellungen finden sich bei Morimoto *et al.*, 1994, und Hightower und Nover, 1991). Sie unterstützen z.B. die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine oder wirken an der Translokation von Proteinen zwischen verschiedenen Zellkompartimenten mit. Dazu binden sie an naszierende oder partiell entfaltete Proteine, verhindern deren Aggregation und Inaktivierung und unterstützen die korrekte Faltung bzw. Rückfaltung. Proteine, die dies leisten können, werden nach dem von Laskey *et al.* (1978) geprägten Begriff '*molekulare Chaperone*' genannt (Ellis, 1990). Heute ist anerkannt, daß die Faltung *in vivo* generell begleitet wird von der Aktivität dieser '*Faltungs-Helfer-Proteine*', die vorwiegend zur Klasse der Hitzeschockproteine gehören (Georgopoulos und Welch, 1993; Hendrick und Hartl, 1993). Die meisten der bisher identifizierten Proteine stammen aus der HSP60-, HSP70- oder HSP90-Familie. Eine Zusammenfassung der Funktionen der wichtigsten Chaperone bei der Proteinfaltung in der Zelle findet sich bei Gething und Sambrook (1992). Weitere inzwischen bekannte Funktionen von HSPs sind z.B. die Beteiligung am Proteinabbau, die durch das Ubiquitin (HSP8.5-Familie) vermittelt wird oder die spezifische Anbindung an Steroid-Hormon-Rezeptoren durch die Proteine der HSP90-Familie, die damit regulierende Aufgaben bei der Signaltransduktion übernehmen.

Chaperoneigenschaften wurden auch für die weit weniger gut untersuchten kleinen Hitzeschockproteine (kHSPs) beschrieben (Horwitz, 1992; Jakob *et al.*, 1993). Sie bilden unter den Streßproteinen die Familie mit der strukturell größten Variabilität. So erstrecken sich ihre molekularen Massen von 16 kDa bei Bakterien bis zu 43 kDa bei Hefe (Ingolia und Craig, 1982; Caspers *et al.*, 1995; Wotton *et al.*, 1996) und in unterschiedlichen Organismen finden sich unterschiedlich viele Repräsentanten dieser Gruppe, von meist zweien bei Säugern bis zu über 30 in höheren Pflanzen (Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996). Die N- und C-Termini der kHSPs variieren stark in ihrer Länge und Aminosäurezusammensetzung und sind damit hauptverantwortlich für die Vielfalt innerhalb dieser Gruppe. Sie flankieren eine evolutionär stark konservierte Region, die α -Crystallin-Domäne, die ein gemeinsames Merkmal aller kleinen HSPs ist, und manchmal auch als Duplikat innerhalb eines Proteins vorliegt (Nene *et al.*, 1986; de Jong *et al.*, 1988). Namensgebend für diese Domäne ist das α -Crystallin, ein Protein, das zusammen mit anderen Crystallinen ca. 90 % der Masse der löslichen Proteine der Augenlinse ausmacht und dort durch die Ausbildung hochgeordneter Proteinaggregate für die Stabilität und die lichtbrechenden Eigenschaften der Linse verantwortlich ist (Wistow und

Piatigorsky, 1988). Das HSP25 der Maus - bei Mensch und Hamster auch als HSP27 bezeichnet¹ (Hickey *et al.*, 1986; Lavoie *et al.*, 1990)- gehört ebenfalls in die Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (Gaestel *et al.*, 1989) und weist eine starke Sequenzhomologie zum α B-Crystallin auf (de Jong *et al.*, 1993; Klemenz *et al.*, 1991). Wie nahezu alle kHSPs sind auch diese beiden Proteine durch die Fähigkeit gekennzeichnet, supramolekulare Strukturen mit molekularen Massen von 200 bis 800 kDa (Spector *et al.*, 1971; Arrigo und Welch, 1987), und darüber hinaus (nach Hitzeschock) große Aggregate bis über 5000 kDa auszubilden (Spector *et al.*, 1971; Arrigo *et al.*, 1988). HSP25 und α B-Crystallin können Mischkomplexen ausbilden. Sie wurden bei der Reinigung der Proteine aus menschlichem Muskelgewebe gefunden (Kato *et al.*, 1992), werden aber auch in Adenovirus-transfizierten Zellen (Zantema *et al.*, 1992) und unter *in vitro*-Bedingungen ausgebildet (Merck *et al.*, 1993). Neben der Chaperoneigenschaft bestehen weitere Ähnlichkeiten zwischen HSP25 und α B-Crystallin darin, daß beide Proteine durch thermische und chemische Streßreize coinduziert werden (Kato *et al.*, 1993; Klemenz *et al.*, 1991; Iwaki *et al.*, 1993; Head *et al.*, 1994) und die Protease-Aktivität von Elastase *in vitro* inhibieren (Ortwerth und Olesen, 1997; Merck *et al.*, 1993).

Die Homologie zwischen den verschiedenen kHSPs beruht vor allem auf starken Ähnlichkeiten in der C-terminalen Hälfte der Proteine, die sich aus der ca. 100 Aminosäure langen α -Crystallin-Domäne und einem kurzen, flexiblen C-terminalen Teil zusammensetzt. Die Funktion der konservierten α -Crystallin-Domäne ist bisher nicht geklärt. Beteiligungen sowohl an der Chaperoneigenschaft (Takemoto *et al.*, 1993; Mehlen *et al.*, 1993) als auch an der Ausbildung der oligomeren Komplexe (Wistow, 1985) werden diskutiert. Der C-terminale Teil ist NMR-Untersuchungen am α -Crystallin zufolge relativ unstrukturiert (Carver *et al.*, 1995). Er unterliegt zahlreichen Modifikationen (Groenen *et al.*, 1994) und scheint in nativen Oligomeren nicht an intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen beteiligt zu sein (Carver *et al.*, 1990; Le Breton und Carver, 1996). Der N-terminale Teil der kHSPs ist sehr variabel mit überwiegend hydrophobem Charakter. Für das HSP16-2 aus *C. elegans* konnte gezeigt werden, daß dieser Bereich für die Assemblierung der Untereinheiten notwendig ist (Leroux *et al.*, 1997).

Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheinen die supramolekularen Komplexe der kHSPs meist als 10-18 nm große globuläre (Siezen *et al.*, 1978a; Behlke *et al.*, 1991) oder torus-ähnliche Strukturen (Longoni *et al.*, 1990b). Aus Circular-Dichroismus- (CD) und Fouriertransformations-Infrarot- (FTIR) Spektroskopie ist bekannt, daß die vorherrschenden Sekundärstrukturelemente der kHSPs β -Faltblätter sind und α -Helices nur einen Anteil von etwa 5-15% ausmachen (Siezen und Argos, 1983; Lamba *et al.*, 1993; Surewicz und Olesen, 1995; Surewicz *et al.*, 1993; Merck *et al.*, 1993; Siezen und Bindels, 1982). Die experimentellen Daten lassen für die Quartärstruktur der kHSPs eine Reihe von Möglichkeiten zu. Für

¹ In dieser Arbeit werden die kleinen Hitzeschockproteine von Maus, Huhn oder Mensch als HSP25 bezeichnet. In einigen anderen Studien wird das menschliche kleine Hitzeschockprotein auch als HSP27 oder HSP28 bezeichnet.

die supramolekularen Komplexe von α -Crystallin wurden unter anderem ein Drei-Lagen-Modell, ein micellenartiger Aufbau, ein aus Tetrameren zusammengesetzter Rhombus und ein zylinderförmiger Aufbau postuliert (zusammengefaßt bei Groenen *et al.*, 1994, und Boelens und de Jong, 1995). Für rekombinantes HSP25 leiteten Behlke *et al.* (1991) aus hydrodynamischen und elektronenmikroskopischen Daten eine kompakte Anordnung aus 32 Monomeren mit hexagonaler Packung ab.

Der oligomere Status der kHSPs wird *in vivo* und *in vitro* von einer Reihe von Faktoren wie pH, Ionenstärke oder Temperatur beeinflußt (Siezen *et al.*, 1980). Die Größe der Komplexe von kHSPs steigt nach einem Hitzeschock in Säugerzellen (Arrigo *et al.*, 1988), Hühnerembryo-Fibroblasten (Collier *et al.*, 1988) oder kultivierten Tomatenzellen (Nover *et al.*, 1989) stark an. Nach einem Hitzeschock und anderen Streßformen kommt es außerdem zu einer Relokalisation der kleinen Hitzeschockproteine aus dem Zytoplasma in oder an den Zellkern (Arrigo *et al.*, 1988; Collier und Schlesinger, 1986). Eine Variation in der Größe der Komplexe wurde auch in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand beobachtet (Kato *et al.*, 1994; Mehlen und Arrigo, 1994). Dies deutet auf die Möglichkeit einer Regulation der supramolekularen Struktur von kHSPs durch posttranslationale Modifikation hin.

Die bei den kleinen HSPs am besten untersuchte Modifikation ist die Phosphorylierung. Sie wurde sowohl für das HSP25 der Ratte (Kim *et al.*, 1984) als auch des Menschen (Arrigo und Welch, 1987) und der Maus (Benndorf *et al.*, 1988a) sowie für α B-Crystallin (Ito *et al.*, 1997) beschrieben. Das HSP25 der Maus weist zwei Phosphorylierungsorte auf und liegt in EAT-Zellen in einer unphosphorylierten und mindestens zwei phosphorylierten Isoformen vor (Benndorf *et al.*, 1988a). Das menschliche HSP25 besitzt zusätzlich einen dritten Phosphorylierungsort (Gaestel *et al.*, 1991; Landry *et al.*, 1992). Murines und humanes HSP25 weisen zwei Phosphorylierungsorte an homologen Stellen auf: Einen nahe des N-Terminus und einen N-terminal der α -Crystallin-Domäne. Alle phosphorylierbaren Reste sind Serine und aus Sequenzvergleichen ergibt sich die Konsensussequenz RxxS als minimales Erkennungsmotiv für die verschiedenen Phosphorylierungsorte der kHSPs.

HSP25 wird nach Einwirkung verschiedener extrazellulärer Stimuli rasch phosphoryliert. Zu den Faktoren, die die Phosphorylierung von HSP25 induzieren können, gehören Phorbol ester, ein Calcium-Ionophor (Kim *et al.*, 1984; Welch, 1985), eine Reihe von mitogenen Signalen und Streßfaktoren (Arrigo und Landry, 1994 und darin zitierte Artikel), darunter auch oxidativer Streß (Mehlen *et al.*, 1995b; Huot *et al.*, 1996; Huot *et al.*, 1997) und Streß durch Scherkräfte (Li *et al.*, 1996). Demgegenüber sind Faktoren, die eine Phosphorylierung von α B-Crystallin bewirken, noch größtenteils unbekannt (Voorter *et al.*, 1989; Chiesa *et al.*, 1987), doch oxidativer Streß scheint auch hier von Bedeutung zu sein (Wang *et al.*, 1995).

Stokoe *et al.* (1992) konnten als verantwortliches Enzym für die Phosphorylierung von HSP25 die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAP-Kinase 2) identifizieren. Sie wird durch Hitzeschock aktiviert (Engel *et al.*, 1995) und erkennt Phosphorylierungsorte der Sequenz LxRxxS (Stokoe *et al.*, 1993). Inzwischen wurden weitere Kinasen beschrieben, die in der Lage sind, HSP25 zu phosphorylieren (Huot *et al.*, 1995; Freshney *et al.*, 1994; Hayess, 1996), und erst kürzlich wurde eine der MAPKAP-Kinase 2 sehr ähnli-

che Kinase, die sogenannte 3pK (Sithanandam *et al.*, 1997) oder MAPKAP-Kinase 3 (McLaughlin *et al.*, 1996) identifiziert. Sie enthält, wie die von Stokoe *et al.* (1993) und von Engel *et al.* (1993) näher charakterisierte MAPKAP-Kinase 2 als typische Merkmale eine SH3-bindende Domäne, eine katalytische Domäne, ein C-terminales Kernlokalisationssignal und die konservierten Serin- und Threoninreste, die durch ihre Phosphorylierung zur Aktivierung der Proteine führen.

Der Hauptaktivator der MAPKAP-Kinasen 2 und 3 ist die p38 MAP-Kinase (Rouse *et al.*, 1994; Freshney *et al.*, 1994). Diese Kinase gehört zur Superfamilie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK oder MAP-Kinasen), zu der die extrazellulär regulierten Proteinkinasen (ERK), die c-jun N-terminalen Kinasen (JNK) und die p38-Kinasen (p38/RK, RK = reaktivierende Kinase) zählen. Jede der MAPK-Gruppen wird über mehr oder weniger separate Signaltransduktionswege reguliert und besitzt distinkte Substratspezifität (Waskiewicz und Cooper, 1995; Derijard *et al.*, 1995). Zusammen sind die MAPKAP-Kinasen 2 und 3 für die Phosphorylierung von HSP25 in Folge der meisten oben genannten Stimulierungen verantwortlich. Damit steht HSP25 also am Ende der Streß-aktivierten Proteinkinase-Signaltransduktionskaskade der p38/RK-Familie der MAP-Kinasen. Aktuelle Zusammenfassungen zum Aufbau und zur Regulation der durch Streß oder Mitogene aktivierten Proteinkinase-Kaskaden finden sich z.B. bei Kyriakis und Avruch (1996a; 1996b), Robinson und Cobb (1997), Cobb und Goldsmith (1995) oder Denhardt (1996).

Die Phosphorylierung von HSP25 spielt auch eine Rolle bei der erworbenen Thermotoleranz. Die Überexpression von HSP25 führt zur Toleranz gegenüber einem sonst letalen Hitzeschock (Landry *et al.*, 1989; Knauf *et al.*, 1992; Lavoie *et al.*, 1993a). Mit der Überexpression einer Phosphorylierungs-inkompetenten Mutante konnte die Thermotoleranz jedoch nicht mehr induziert werden (Lavoie *et al.*, 1995). Bei dieser Untersuchung ergab sich außerdem, daß das Mikrofilamentsystem der Zelle unter Streßbedingungen durch phosphorylierbares HSP25, nicht aber durch die nicht phosphorylierbare Mutante, stabilisiert wird. Damit liegt der Schluß nahe, daß die Schutzfunktion von HSP25 während eines Hitzeschocks in der Aufrechterhaltung des Actinfilament-Netzwerkes liegt und daß diese Funktion über die Phosphorylierung des Proteins reguliert wird. Diese Vermutung wurde noch bestärkt, da nach einer Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D, einem starken Zytoskelett-Gift, nur das Wildtyp-HSP25 den Wiederaufbau der Actinfilamente beschleunigen konnte. Kürzlich konnten Huot *et al.* (1996) zeigen, daß in CCL39-Zellen überexprimiertes HSP25 die Zellen resistent macht gegen eine durch oxidativen Streß (H_2O_2 oder Menadion) induzierte Actinfilament-Fragmentierung. Auch hier blieben die Zellen, die die nicht phosphorylierbare Mutante überexprimierten, sensitiv gegenüber dem Streß. Die regulatorische Beziehung von HSP25 zum Actinnetzwerk der Zelle wird außerdem durch die Tatsache unterstrichen, daß einige Substanzen, die in der Lage sind, die HSP25-Phosphorylierung zu induzieren, auch die Organisation des Zytoskeletts beeinflussen, z.B. Hitzeschock (Glass *et al.*, 1985; Welch und Suman, 1985), Cisplatin (Oesterreich *et al.*, 1991b) oder $TNF\alpha$ (Camussi *et al.*, 1991; Arrigo, 1990).

Daß HSP25 Wechselwirkungen mit Actin eingeht und damit an der Organisation des Mikrofilament-Netzwerkes beteiligt ist, konnte auch mit anderen Experimenten gezeigt werden. Miron *et al.* beschrieben 1988 die Hemmung der Actinpolymerisation *in vitro* durch ein aus Truthahnmuskulatur gewonnenes Protein. 1991 konnte die gleiche Gruppe zeigen, daß es sich bei diesem Protein, daß sie zunächst aufgrund dieser Eigenschaft als IAP-Protein bezeichneten (*inhibitor of actin polymerisation*), um das kleine Hitzeschockprotein HSP25 handelt (Miron *et al.*, 1991). Sie charakterisierten es als ein *'barbed end capping protein'*. Neuere Untersuchungen von Benndorf *et al.* (1994) mit aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen isoliertem HSP25 bestätigen diese Ergebnisse und belegen, daß die Eigenschaft, die Actinpolymerisation zu hemmen, vom Phosphorylierungszustand und Assoziationsgrad des Streßproteins abhängig ist: Nur unphosphoryliertes, monomeres HSP25 hemmt die Actinpolymerisation, phosphoryliertes oder zu supramolekularen Komplexen assoziiertes HSP25 dagegen nicht. In einem erst kürzlich erschienen Übersichtsartikel haben Liang und MacRae (1997) die Beziehungen zwischen Chaperonen und dem Zytoskelett zusammengefaßt.

Die Regulation der schnellen und transienten Umschaltung von der Synthese der normalen Haushaltsproteine zur Produktion der HSPs nach Streß steht unter der Kontrolle spezifischer Transkriptionsfaktoren, den Hitzeschockfaktoren (HSF). Für HSP70 ist die Genregulation in ihren Grundzügen bekannt: Der Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) wird konstitutiv exprimiert und liegt in ungestreßten Zellen in monomerer und inaktiver Form vor. Unter Streß kommt es zu einer Aktivierung des HSF1 durch eine Phosphorylierungs-abhängige Trimerisierung. Die aktive Form reichert sich anschließend im Zellkern an und bindet an spezifische Hitzeschock-elemente (HSEs) in der Promotorregion von hsp-Genen und stimuliert so deren Transkription. Die inaktive, monomere Form von HSF1 wird vermutlich durch eine Anbindung an HSP70 stabilisiert (Hilt und Wolf, 1996). Wenn durch Streß der Anteil an denaturierten Proteinen steigt (siehe oben), bindet HSP70 mit höherer Affinität an diese Proteine, um ihre Aggregation zu verhindern und die Rückfaltung in den nativen Zustand zu unterstützen. Dadurch wird in verstärktem Maße HSF1 frei, der nun die Aktivierung der Transkription von Hitzeschockproteinen bewirkt. Einen Überblick über die Transkriptionsregulation von Hitzeschockgenen geben Lis und Wu (1994). Die Regulation der Induktion von kHSPs ist nicht vollständig aufgeklärt. Es bestehen jedoch einige Unterschiede im Vergleich zu anderen HSPs bezüglich der Streß-induzierten Aktivierung der Transkription. So wird z.B. die Induktion von kHSPs schon bei etwas niedrigeren Temperaturen stimuliert als die von HSP70 (Yost *et al.*, 1990). Auch eine verstärkte Synthese von HSP25 ohne Veränderungen bei der Transkription wurde beobachtet (Gotthardt *et al.*, 1996). Außerdem wird die Regulation der Transkription von HSP25 nicht nur durch Hitzeschockfaktoren induziert, sondern korreliert auch mit dem Hormon-Level.

Das Gen für HSP25 beinhaltet drei Exons und zwei Introns und besitzt in seiner Promotorregion das typische Hitzeschockelement der Hitzeschockproteine. Daneben sind dort außerdem eine Reihe von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren vorhanden, wie z.B. zwei TATA-Boxen, zwei SP1-Bindungselemente und ein halb-palindromisches Östrogenrezeptor-bindendes Element (Gaestel *et al.*, 1993). Die letztgenannte Bindungsstelle ist vermutlich für

die relativ starke Expression des Proteins in Östrogenrezeptor-positiven Zellen verantwortlich, wohingegen HSP25 in den meisten anderen Geweben nur in geringen Mengen vorkommt. Verstärkt exprimiert wird HSP25 auch in menschlichen Mammakarzinomen (Ciocca *et al.*, 1993), in Mammakarzinom-Zelllinien wie MCF-7 (Dunn *et al.*, 1993) und in Ehrlich-Ascites-Tumor- (EAT) Zellen (Benndorf *et al.*, 1988b; Benndorf *et al.*, 1988a; Gabai *et al.*, 1995). Die Korrelation der HSP25-Expression mit dem Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren ist möglicherweise von Bedeutung bei der Tumordiagnose. So finden sich bei Mammatumoren erhöhte HSP25-Level in den Östrogenrezeptor-positiven Zellen. Allerdings ist die Bewertung von HSP25 als prognostischer Marker in diesen Tumoren umstritten (zusammengefaßt bei Ciocca *et al.*, 1993). In anderen Tumoren, wie Neuroblastomen, wird die Expression von HSP25 mit einer positiven Vorhersage für den Krankheitsverlauf verknüpft (Ungar *et al.*, 1994) und in Endometriumkarzinomen wird es als potentieller Marker der Tumorzellen-Differenzierung gewertet (McGuire *et al.*, 1986; Ciocca *et al.*, 1989). Differenzierungsabhängig wird HSP25 auch in der embryonalen Karzinom-Zelllinie P19 akkumuliert (Stahl *et al.*, 1992).

Außer in Tumoren werden kHSPs auch unter einer Reihe von anderen pathophysiologischen Bedingungen verstärkt exprimiert. 1989 belegten Iwaki *et al.*, daß α B-Crystallin ein Hauptbestandteil der Rosenthal-Fibern ist. Diese abnormalen Einschlüsse in Astrocyten sind ein charakteristisches Merkmal des Alexander-Syndroms. Später wurde nachgewiesen, daß dort ebenfalls HSP25 akkumuliert wird (Iwaki *et al.*, 1993; Head *et al.*, 1993). Auch bei anderen Erkrankungen des Nervensystems, wie Alzheimer (Shinohara *et al.*, 1993; Renkawek *et al.*, 1994a; Renkawek *et al.*, 1994b), Chorea Huntington, Multipler Sklerose (Iwaki *et al.*, 1992; van Noort *et al.*, 1995) oder der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Renkawek *et al.*, 1992) kommt es zur Anreicherung der beiden kHSPs. Das gemeinsame Kennzeichen dieser neurodegenerativen Erkrankungen ist die Ablagerung von fehlgefalteten Proteinen in Fibern, Einschlüssen oder Plaques im Nervensystem (Thomas *et al.*, 1995). Dieses Phänomen könnte die Beteiligung von Hitzeschockproteinen bzw. Chaperonen erklären. Inzwischen ist eine verstärkte Expression auch bei nephrotischem Syndrom in den Glomeruli (Smoyer *et al.*, 1996), bei cerebraler Ischämie im Gehirn (Wagstaff *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1995) und nach Myokard-Ischämie im Herzen (Chiesi *et al.*, 1990) beobachtet worden.

Im Muskelgewebe, speziell im Herzmuskel, kommen HSP25 und α B-Crystallin auch unter physiologischen Bedingungen in relativ großen Mengen vor (Bhat *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1991; Klemenz *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1994; Longoni *et al.*, 1990a; Gernold *et al.*, 1993). Erhöhte Konzentrationen an Hitzeschockproteinen im Myokard wurden mit einem Schutz vor den Folgen einer Ischämie/Reperfusion oder anderen Streßsituationen wie Hypoxie, ATP-Mangel oder Hypertonie in Verbindung gebracht (Zusammenfassungen bei Knowlton, 1995, und Mestril und Dillmann, 1995). Für HSP70 wurde eine kardioprotektive Wirkung sowohl nach Transfektionen in isolierten Herzmuskelzellen (Heads *et al.*, 1994; Mestril *et al.*, 1994) als auch bei transgenen Tieren beobachtet (Marber *et al.*, 1995; Plumier *et al.*, 1995) und neuerdings wurde sie auch für HSP25 und α -Crystallin beschrieben (Martin *et al.*, 1997).

Einer besonderen Belastung unterliegt das Herz bei chronisch erhöhtem Blutdruck, der Hypertonie. Für die Untersuchung der Hypertonie existieren verschiedene Tiermodelle, vor allem bei Ratten. Bei den sogenannten spontan hypertensiven Ratten (SHR) steigt mit zunehmendem Alter der Blutdruck stark an und führt im Falle der stroke-prone Züchtung (SHRSP) in den meisten Fällen zu einem Schlaganfall (*stroke-prone* = zum Schlaganfall neigend). Der Mechanismus der Ausbildung des Bluthochdruckes ist bei diesen Tieren nicht bekannt. In den 30er Jahren etablierte Harry Goldblatt ein experimentelles Modell zum renovaskulären Bluthochdrucks. Dabei wird durch einen operativen Eingriff der Blutfluß in den Nieren eingeschränkt. Dadurch kommt es zu einer Steigerung in der Renin-Sekretion, der Plasma-Renin-Aktivität und der Produktion von systemischem Angiotensin II. Dies führt letztlich zu einem Anstieg des Blutdruckes in einem vergleichbaren Maße, wie dies bei der erworbenen Hypertonie der Fall ist. Ein weiteres Modell der Hypertonie repräsentieren die sogenannten TGR(mREN2)27-Ratten, denen das Mäuse-Renin-2-Gen eingeschleust wurde (Mullins *et al.*, 1990). Bei diesen transgenen Tieren kommt es ebenfalls zu einer erhöhten Produktion von Renin und damit zur Ausbildung einer Hypertonie.

Die Ätiopathogenese der Hypertonie ist noch immer ungeklärt, aber es ist allgemein akzeptiert, daß die Krankheit aus dem Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren resultiert. So reagieren z.B. hypertone Ratten auf erhöhte Temperatur mit einer stärkeren Steigerung des Blutdruckes, als dies bei normotonen Ratten der Fall ist (Malo *et al.*, 1988). Dies bestätigen auch Versuche mit kultivierten Kardiomyozyten und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) aus genetisch bedingt hypertonen Ratten. Ein Teil der Unterschiede im Blutdruck zwischen normotonen und hypertonen Tieren kann damit auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Hitzestress zurückgeführt werden. Als Kandidatengene für diese Empfindlichkeit gegenüber Umweltreizen werden unter anderem die von Tumornekrosefaktor und HSPs genannt (Pravenec *et al.*, 1991). Dementsprechend wurde eine erhöhte Akkumulation von HSP70-mRNA und HSP25-mRNA im Herzen, der Aorta und den Nieren von spontan hypertensiven Mäusen und in kultivierten SHR-VSM-Zellen beschrieben (Kunes *et al.*, 1992; Hamet *et al.*, 1990). Neuerdings konnte ein HSP25-Allel in F2-Kreuzungen von spontan hypertensiven Ratten auch mit einer linksventrikulären Hypertrophie assoziiert werden (Hamet *et al.*, 1996). Als Basis der verstärkten Expression wird eine abnormale Aktivität des Hitzeschockfaktors oder ein genetischer Polymorphismus diskutiert (zusammengefaßt bei Hamet, 1995). Der Nachweis von Hitzeschockproteinen im Herzgewebe von normalen und hypertonen Tieren läßt Rückschlüsse auf eine eventuelle kardioprotektive Funktion der Proteine zu und kann dadurch für klinische Fragestellungen von großem Interesse sein.

1.1 Ziel der Arbeit

Ein allgemeines Kennzeichen aller kHSPs ist ihre Fähigkeit, hochmolekulare Komplexe auszubilden. Ohne ein genaues Bild von der Struktur der kleinen Hitzeschockproteinen und der Art und Weise, wie sie mit ihren Substraten wechselwirken, kann die Funktionsweise dieser sowohl unter physiologischen wie auch unter unphysiologischen Bedingungen wichtigen Proteine nicht verstanden werden. Trotz einiger Anstrengungen in den letzten Jahren gibt es noch keine konkrete Vorstellung über die dreidimensionale Struktur der Monomere und der supramolekularen Komplexe von HSP25, da bisher keine Kristallstrukturen von kHSPs vorhanden sind und sich die Komplexe aufgrund ihrer Größe für Kernspinresonanzspektroskopische (NMR) Untersuchungen nicht eignen.

Da Voruntersuchungen Hinweise auf eine ringartige Organisation der Komplexe bei aus EAT-Zellen aufgereinigtem HSP25 gaben und sie sich damit grundlegend von den mehr globulären Komplexen des rekombinanten Proteins unterscheiden würden, sollten im Rahmen dieser Arbeit durch den kombinierten Einsatz elektronenmikroskopischer und hydrodynamischer Methoden neue Informationen über die Struktur der Komplexe gewonnen werden. Dafür war es notwendig, zunächst ein Protokoll zur schonenden Aufreinigung des Proteins zu erarbeiten, um eine homogene, native Fraktion zu gewinnen, die zur Strukturuntersuchung verwendet werden konnte. Aufgrund von Erfahrungen zum Vorkommen des Proteins waren Ehrlich-Ascites-Tumorzellen die geeignete Quelle für diese Versuche. Um außerdem die Auswirkungen von Modifikationen auf den Assoziationsgrad der Komplexe studieren zu können, waren Untersuchungen zur Struktur der Komplexe von rekombinantem HSP25 sowie verschiedener Mutanten vorgesehen.

Aus einer Reihe von Untersuchungen ist bekannt, daß HSP25 mit Actin wechselwirkt. Dabei werden dem Protein sowohl stabilisierende Effekte auf das Zytoskelett *in vivo* als auch eine Hemmung der Actinpolymerisation *in vitro* zugeschrieben. Die Fähigkeit, die Actinpolymerisation zu hemmen, kann mit einem fluoreszenzspektroskopischen Ansatz und mit Hilfe der Elektronenmikroskopie getestet werden und ist offenbar auf monomeres nichtphosphoryliertes HSP25 beschränkt. Dies sollte durch die Verwendung von nativem und rekombinantem HSP25 sowie von HSP25-Mutanten verifiziert werden.

Welche Bereiche von HSP25 für die Interaktion mit dem Actin verantwortlich sind, ist noch ungeklärt. Eine Möglichkeit, etwas zur Klärung dieser Frage beizutragen, bestand in der Verwendung von HSP25-Peptiden, mit denen versucht werden sollte, die Hemmung der Actinpolymerisation nachzuvollziehen. Unter Einsatz der genannten Techniken war es das Ziel, die für die Actinpolymerisations-hemmende Funktion verantwortlichen Bereiche von HSP25 zu bestimmen und mögliche Regulationsmechanismen bei der Wechselwirkung mit Actin zu identifizieren. Hier bot sich außerdem die Verwendung von Peptiden mit Sequenzen aus anderen kleinen HSPs an, um mögliche Gründe für funktionelle Unterschiede bei der Wechselwirkung mit Actin herauszufinden. Mittels hydrodynamischer Methoden sollte die

Stärke der Wechselwirkungen zwischen Actin und Peptiden der kHSPs sowie das Assoziationsverhalten der Peptide selbst untersucht werden. Des weiteren sollte getestet werden, inwieweit Zellulose-gebundene Peptid-Bibliotheken bei der Bestimmung der Interaktionsbereiche von HSP25 und Actin behilflich sein können.

Die Bedeutung von HSP25 als möglichem Regulator von Actin-gebundenen Funktionen der Zelle wird durch die Tatsache bestätigt, daß das Protein in - Actin-reichem - Muskelgewebe verstärkt vorzufinden ist. Dadurch bekommen kHSPs im kardiovaskulären System auch eine große medizinische Relevanz. Über die Rolle, die HSP25 dort spielt, ist allerdings nur wenig bekannt. Demgegenüber ist die protektive Bedeutung von HSP70 im Herzen gut dokumentiert. Da ein Zusammenspiel dieser beiden HSPs unter Streßbedingungen denkbar ist, sollte ein Teil der vorliegenden Arbeit der Analyse des Vorkommens von HSP25 und HSP70 im Herzen und in verschiedenen anderen Geweben unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen gewidmet werden. Eine verbreitete Erkrankung, bei der das Herz außerordentlich stark belastet wird, ist die Hypertonie. Gut geeignete Objekte für die Untersuchung dieser besonders für den Menschen bedeutungsvollen Erkrankung sind Ratten mit normalem und gesteigertem Blutdruck. Durch den parallelen Nachweis des Vorkommens von HSP25 und HSP70 in Geweben der in der Einleitung vorgestellten Modelle sollte Hinweisen 1.) auf eine eventuelle protektive Funktion der Proteine und 2.) auf eine mögliche gekoppelte Expression der beiden Proteine unter diesen pathophysiologischen Bedingungen nachgegangen werden. Durch die Quantifizierung der Menge an HSP25 in den Gewebeproben böte sich außerdem die Möglichkeit, die Ergebnisse mit den Daten aus anderen Untersuchungen zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung von HSP25 aus EAT

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von HSP25 wurde die Bauchhöhlenflüssigkeit von 50 Balb-c Mäusen mit induziertem Ehrlich-Ascites-Karzinom (12 bis 15 Tage nach der Transplantation) verwendet (Bielka *et al.*, 1994; Benndorf *et al.*, 1988a). Die Aufreinigung des nativen Proteins erfolgte in mehreren Schritten mittels Zellaufschluß, Ammoniumsulfatfällung und Säulenchromatographie aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. Zu allen Präparationsschritten wurden jeweils frisch Proteaseinhibitoren in folgenden Endkonzentrationen hinzugegeben: 1 µg/ml (0,15 µM) Aprotinin, 0,7 µg/ml (1 µM) Pepstatin A, 1 µg/ml (0,15 µM) Leupeptin, 35 µg/ml (200 µM) PMSF, 0,15 mg/ml (1 mM) Benzamidin. Alle Aufreinigungsschritte erfolgten bei 4°C. Die Elution der Proteine in den Chromatographie-Schritten wurde über die Extinktionen bei 280 nm verfolgt. Die ausgewählten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2) auf ihren Gehalt an HSP25 geprüft, wobei das rekombinante HSP25 als Referenz diente. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben in den verschiedenen Aufreinigungsstufen erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode.

Die Größe und Form der Proteine bzw. Proteinkomplexe wurde an ausgewählten Fraktionen mittels Elektronenmikroskopie (siehe Kapitel 2.7) und analytischer Ultrazentrifugation (siehe Kapitel 2.8) überprüft.

2.1.1 Zellaufschluß

Die den Mäusen entnommene EAT-Flüssigkeit wurde in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von ca. 1:2 aufgenommen und die Ausbeute an Tumorzellen mit Hilfe einer Neugebauer-Zählkammer ermittelt. Dann wurden die Zellen 3 x mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, anschließend in Lösung A (10 mM HEPES, pH 7,4; 10 mM CH₃COOK; 1 mM (CH₃COO)₂Mg; 1 mM DTE; 0,2 mM PMSF; 0,1% Triton X-100) aufgenommen, 15 min quellen gelassen und nach Zugabe von 0,1 Teil Lösung B (2 M CH₃COOK; 50 mM MgCl₂) in einem eng sitzenden Teflon-Glas-Homogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 20 min bei 10.000 g und 135 min bei 80.000 g zentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C aufbewahrt.

2.1.2 Ammoniumsulfatfällung

Nach dem Auftauen von ca. 50 ml des Rohextraktes erfolgte eine vorsichtige Ammoniumsulfat-Fällung bis zu einer Sättigung von 45%. Nach einer Präzipitationszeit von 30 min wurde der Niederschlag bei 15.000 g für 20 min abzentrifugiert, in Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5 % Glycerin; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTE; 1 mM Benzamidin) aufgenommen

und anschließend gegen diesen Puffer über Nacht dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung nochmals abzentrifugiert und der erhaltene Überstand weiter aufgereinigt.

2.1.3 DEAE-Cellulose-Säule

Der Extrakt der Ammoniumsulfatfällung (ca. 30 ml) wurde auf eine mit Säulenpuffer äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (2,5 x 23 cm; DE52 Whatman) gebracht und mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 0,25 M in Säulenpuffer von je 200 ml eluiert. Die HSP25-haltigen Fraktionen (6 ml-Fraktionen) wurden vereinigt, mit Hilfe eines Centricon Microconcentrators 10 (Amicon, Danvers, USA) aufkonzentriert und für die anschließende Hydroxylapatit-Chromatographie auf 15 mM Kaliumphosphat in Säulenpuffer eingestellt.

2.1.4 Hydroxylapatit-Säule

Der Pool der HSP25-haltigen Fraktionen aus der DEAE-Chromatographie wurde auf eine Hydroxylapatit-Säule (1,5 x 14 cm; Bio-Gel HT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) gegeben, die gegen 50 mM K-Phosphat in Säulenpuffer äquilibriert war. Zur Elution der Proteine wurde nach dem Vorlauf ein linearer K-Phosphat-Gradient von 50 mM bis 250 mM in Säulenpuffer (in 5 ml) angelegt. Unter diesen Bedingungen bindet das HSP25 nicht an die Säule und wird mit dem Waschpuffer eluiert. Die HSP25-haltigen Fraktionen wurden dann vereinigt, mit Hilfe eines Centricon Microconcentrators 10 (Amicon, Danvers, USA) aufkonzentriert und gegen den Säulenpuffer dialysiert.

2.1.5 Mono Q-Säule

Der letzte Chromatographieschritt erfolgte an einer mit Säulenpuffer äquilibrierten Mono Q HR 5/5 Säule (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Nach dem Auftragen der Probe wurden die Proteine mit einem Gradienten von 0 bis 400 mM NaCl in Säulenpuffer eluiert. Das HSP25 löste sich im Bereich von etwa 100 bis 200 mM NaCl von der Säule.

2.1.6 Isolierung und Fraktionierung von HSP25-Spezies

Für die strukturelle Charakterisierung des nativen HSP25 wurde auf ein HSP25-Präparat zurückgegriffen, das im Labor von R. Benndorf (MDC, Berlin) nach einem sehr ähnlichen Aufreinigungsschema isoliert wurde, wie es hier dargestellt ist (Benndorf *et al.*, 1994). Die dort nach der Säulenchromatographie erhaltenen Präparationen von HSP25 enthielten sowohl niedermolekulares Material als auch HSP25-Komplexe in verschiedenen Assoziationsstufen. Um die verschiedenen HSP25-Spezies voneinander zu trennen, wurden 750 µl der HSP25-haltigen Lösung über einem Kissen von 150 µl 30%iger Saccharose in Zentrifugations-Puffer

(2 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,2 mM Na₂ATP; 0,5 mM β -ME; 20 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM NaN₃) für 105 min bei 36.000 g zentrifugiert. Die oberen zwei Drittel wurden anschließend als Überstand (Fraktion 1) abgenommen und das pelletierte Material mit dem HSP25-Komplexen wurde auf eine mit Zentrifugationspuffer + 5% Glycerin äquilibrierte Sepharose 6B-Säule (3 x 200 mm; Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Die im Ausschlußvolumen eluierten Proteine wurden erneut auf diese Säule gegeben und die ersten Fraktionen (Fraktionen 2,3 und 4) enthielten die verschiedenen Spezies der HSP25-Komplexe.

2.2 HSP25-Expression in *E.coli*, Isolierung und in vitro-Phosphorylierung

Das rekombinante HSP25 der Maus und des Menschen sowie die Deletionsmutante HSP25 Δ C18 des murinen Proteins wurden unter der Kontrolle des T7 Promotors in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert wie bei Gaestel *et al.* (1989) beschrieben. Für die Mutagenese der Serine des menschlichen HSP25 wurde der QuickChange Site-Directed Mutagenese Kit (Stratagene, USA) mit den entsprechenden Oligonukleotiden verwendet. Die mutierten Klone wurden durch Expression in *E. coli* BL21 (DE3) und Sequenzierung identifiziert. Die rekombinanten Proteine wurden durch Ammoniumsulfat-Präzipitation und Chromatographie an einer DEAE-Sepharose CL6-6B-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gereinigt. Die *in vitro*-Phosphorylierung von rekombinantem humanem HSP25 wurde mit Hilfe der MAP-KAP-Kinase 2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA) wie bei Stokoe *et al.* (1992) beschrieben, aber ohne die Verwendung von radioaktiv markiertem ATP, durchgeführt. Alle Arbeiten wurden im Labor von M. Gaestel (MDC, Berlin) durchgeführt. Die rekombinanten Proteine wurden freundlicherweise von ihm zur Verfügung gestellt.

2.3 Actin-Präparation und -Markierung

2.3.1 Präparation von Actin

Fibrilläres Actin (F-Actin) wurde mit geringen Änderungen nach der Methode von Pardee und Spudich (1982) aus Muskel-Aceton-Pulver von Kaninchen präpariert. Dabei erfolgten alle Schritte bis zur Ultrazentrifugation in Puffer A (2 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,2 mM CaCl₂; 0,2 mM Na₂ATP; 1 mM NaN₃). Tab. 2.1 gibt die einzelnen Schritte der Aufreinigung wieder, die alle im Eisbad bzw. bei 4°C durchgeführt wurden.

Tab. 2.1: Aufreinigungsschritte bei der Actin-Präparation

	Schritt	Bedingungen	Zeit
1	Extraktion	rühren in 20 ml Puffer A/ g Muskel-Pulver	30 min
2	Separation des Extraktes	2.500 g -Zentrifugation	10 min
3	Reextraktion	in 20 ml Puffer A/ g Muskel-Pulver	30 min
4	Separation des Extraktes	2.500 g -Zentrifugation	10 min
5	Vereinigung der Überstände		
6	Zentrifugation	25.000 g	25 min
7	Polymerisation des Überstandes	ad 50 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM Na ₂ ATP	120 min
8	Salzwäsche	ad 600 mM KCl (unter Rühren)	30 min
9	Zentrifugation	100.000 g	100 min
10	Lösen der Pellets	aufnehmen in 3 ml Puffer D/ g Muskel-Pulver	60 min
11	Dialyse	in 1 Liter Puffer D	3 x 12 h
12	Konz.-Bestimmung	photometrisch bei 290 nm	

Für die Depolymerisation des F-Aktins zu globulärem Actin (G-Actin) wurde dann 3 x für 12 Stunden gegen 1 Liter Puffer D dialysiert (2 mM Imidazol-HCl, pH 7.0; 0.1 mM CaCl₂; 0.2 mM Na₂ATP; 1 mM DTT; 1 mM NaN₃). Durch eine anschließende Zentrifugation für 2 h bei 150.000 g (TLA Rotor 100.3, Beckman, Palo Alto, USA) wurde das nicht depolymerisierte Actin abgetrennt und der Überstand mit dem G-Actin aufgehoben. Hiervon wurde unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten von $2.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 290 nm (Pollard, 1983; Houk, Jr. und Ue, 1974) photometrisch die Konzentration bestimmt. Außerdem wurden der S₂₀-Wert und das Molekulargewicht des G-Actins mittels der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt, um die Reinheit und den Depolymerisationszustand des G-Actins zu kontrollieren. Das G-Actin wurde bei 4°C aufbewahrt und innerhalb von 1 Woche verwendet oder durch Salz- und ATP-Zugabe (KCl ad 50 mM; MgCl₂ ad 2 mM; Na₂ATP ad 1 mM) polymerisiert. Die Darstellung von G-Actin aus diesem F-Actin erfolgte durch einen erneuten Zyklus von Zentrifugation, Lösen des Pellets und Dialyse analog der Schritte 10 bis 12 bei der G-Actin-Aufreinigung (siehe Tab. 2.1).

2.3.2 Präparation von Fluoreszenz-markiertem Actin

Für die Darstellung von markiertem Actin für die fluoroszenzphotometrische Messung der Actinpolymerisation wurde zunächst frisch präpariertes F-Actin für 3 x 12 Stunden gegen Puffer C dialysiert (1 mM NaHCO₃, pH 7.6; 0.1 M KCl; 1 mM MgCl₂; 0.1 mM CaCl₂; 0.2 mM Na₂ATP; 1 mM NaN₃), da das Tris aus Puffer A die Konjugierungsreaktion mit dem Marker stören würde. Die Marker-Lösung wurde frisch hergestellt aus 500 µl Dioxan, 250 µl Aceton und 1,5 mg N-(1-Pyrenyl)jodacetamid (Molecular Probes, Eugene, USA). Das dialysierte F-Actin wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und für 20 h im Dunkeln bei 20°C mit 15 µl der Marker-Lösung pro ml Actin-Lösung inkubiert (Kouyama und Mihasi, 1981; Pardee und Spudich, 1982). Danach wurde der überschüssige Marker durch Zugabe von 1 % Zellulose (voräquilibriert in Puffer C) entfernt und das markierte F-Actin

anschließend durch eine Zentrifugation von 100 min bei 100.000 g (T-647.5 Rotor, Sorvall®, DuPont Company, Wilmington, USA) sedimentiert. Das Pellet wurde in ca. 1 ml Puffer D/0,1 mg Muskelpulver resuspendiert und 3 x 12 h gegen je 1 Liter Puffer D dialysiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (2 h; 150.000 g; TLA Rotor 100.3, Beckman, Palo Alto, USA) wurde der Überstand mit dem markierten G-Actin (Pyrenyl-Actin) dekantiert und die Konzentration bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von Pyren beträgt $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 344 nm. Die Absorption von Pyren bei 290 nm ($E_{344} \times 0.127$) wurde für die Berechnung der Pyrenyl-Actin-Konzentration vom E_{290} -Wert abgezogen (Cooper *et al.*, 1983). Frisch präpariertes Pyrenyl-Actin wurde entweder innerhalb 1 Woche verwendet oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei - 70°C aufbewahrt.

2.3.3 Präparation von Actin-Keimen

Für die Polymerisationsmessungen wurden zur Auslösung der Polymerisationsreaktion Actin-Keime eingesetzt. Sie wurden durch die Polymerisation von unmarkiertem G-Actin (34,5 μM) in Puffer D durch die Zugabe von 0,1 Volumen einer 500 mM KCl- und einer 100 mM Imidazol-Lösung erzeugt. Diese Actinlösung wurde nach einem Tag auf 11,5 μM verdünnt und vor dem Gebrauch einige Stunden äquilibriert (Pollard, 1983).

2.4 Bestimmung des HSP25- und HSP70-Gehaltes in Gewebeproben

2.4.1 Gewebeaufarbeitung

Für die Bestimmung des Gehaltes an den beiden Streßproteinen HSP25 und HSP70 wurden je 3 Kontrolltiere und 3 Tiere verschiedener Ratten-Modelle für Hypertonie verwendet. Als Kontrollen dienten Tiere des Wistar-Kyoto oder Sprague-Dawley-Stammes. Als Hypertonie-Modelle wurden spontan hypertensive Ratten (SHRSP), transgene Ratten mit einem zusätzlichem Mäuse-Renin-2-Gen (TGR(mREN2)27) und Tiere mit einer experimentell induzierten Hypertonie untersucht. Alle Tiere wurden entsprechend den tierschutzrechtlichen Richtlinien gehalten und behandelt. Die spontan hypertensiven und transgenen Ratten wurden freundlicherweise von Dr. Bohlender (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die experimentelle Hypertonie wurde durch das Abklemmen einer Nierenarterie nach der 2kidney-1clip-Methode (2K1C) induziert. Diese sogenannten Goldblatt-Operationen und die Kontrolle der Blutdruckwerte wurde im Labor von Prof. Haller (Franz-Volhard-Klinik, Berlin) von D. Dragun durchgeführt. Die Kontrolltiere wurden einer Scheinoperation unterzogen.

Die Ratten waren zum Zeitpunkt der Organentnahme ca. 7-9 Monate (SHRSP-Modell) bzw. 2 Monate (transgenes Modell) alt. Die operierten Tiere wurden nach 1 bzw. 4 Wochen untersucht. Dazu wurden die Tiere mit Barbiturat betäubt und auf der Bauchseite geöffnet. Die zu untersuchenden Organe wurden mit einer anatomischen Pinzette entnommen und in physiolo-

gischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gespült. Die Herzen wurden vor der Weiterverarbeitung in rechten Ventrikel, linken Ventrikel, Septum und Vorhöfe zerteilt.

Die für die Western-Blot-Analyse bestimmten Gewebeproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C aufbewahrt. Von den Proben wurde dann später im gefrorenen Zustand ein Stückchen abgeschnitten, ausgewogen und mit 10 µl Homogenisationspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4 % SDS; 10 % β-ME; 20 % Glycerin) pro mg Feuchtgewicht in einem eng sitzenden Gewebe-Homogenisator mazeriert. Anschließend wurde das Homogenat für 3 min im Wasserbad gekocht und 5 min bei 10.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum Auftragen auf die Elektrophorese eingefroren.

2.4.2 Quantifizierung

Für die Auswertung wurden die Western-Blot-Membranen mittels eines Sharp JX 610-Flachbettscanners mit 300 dpi digitalisiert und die Bandenintensitäten mit Hilfe des Grafikprogrammes NIH-Image 1.55 ausgewertet. Für den Vergleich der aufgetragenen Gesamtproteinmenge wurden die Ponceau-gefärbten Blots ebenfalls gescannt, die Gesamtintensität der einzelnen Probenbanden miteinander verglichen und nach der Mittelwertbestimmung ein Korrekturfaktor für die aufgetragene Proteinmenge im Vergleich zu den anderen Proben desselben Blots bestimmt. Um diesen Faktor wurden dann die Werte für die Proteinbanden bei der anschließenden Auswertung korrigiert. Damit wurde sichergestellt, daß bei dem Vergleich der Proben die gleiche geblottete Gesamtproteinmenge zugrundegelegt wurde.

Um eine Quantifizierung des HSP25- und HSP70-Gehaltes der Gewebeproben zu ermöglichen, wurden bei der Elektrophorese jeweils 5 Standards unterschiedlicher Konzentration mit aufgetragen. Bei diesem internen Standard handelte es sich um einen Zellaufschluß von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. In diesem sind in relativ großer Menge HSP25 und auch HSP70 enthalten. In einem Abgleich wurde zuvor der Standard gegen isoliertes rekombinantes HSP25 aufgetragen, von dem durch eine Aminosäureanalyse die genaue Konzentration bekannt war, so daß der Absolutgehalt an diesem Protein auch in den untersuchten Proben ermittelt werden konnte. Für HSP70 wurden nur relative Werte ermittelt

Die HSP-Konzentration der zu untersuchenden Proben lag im Bereich derjenigen des Standards. Bei jedem Blot wurde aus den gemessenen integrierten Pixelintensitäten der EAT-Standards eine Eichgerade erstellt und die relative Menge an HSP im Vergleich dazu ermittelt. Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte und damit deutlich getrennten Positionen auf den Western-Blots konnte der Gehalt an diesen beiden HSPs bei den jeweiligen Proben gleichzeitig bestimmt werden. Für HSP25 wurde er auf µg Protein/g Feuchtgewicht (FG) geeicht.

2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Proteinanalyse erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) in einer Bio-Rad-Mini-Protean Apparatur (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) über ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Trenngel von 7,5-17 % Acrylamid unter einem 3% igem Sammelgel. Die Gelgröße betrug 7 x 8 cm bei einer Dicke von 1 mm. Die Gele wurden in einem BioRad Mini-Protean Gelgießstand mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen. Das Pipettierschema und die verwendeten Puffer für die Herstellung der Gele sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit doppelt konzentriertem Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4 % SDS; 10 % β -ME; 20 % Glycerin; 0.005 % Bromphenolblau) gemischt, 5 min im Wasserbad gekocht und vor dem Auftragen auf das Gel kurz abzentrifugiert. Als Proteinstandard wurde eine Mischung aus Standardproteinen (Serva, Heidelberg) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 bis 150 V für 1 bis 1,5 Stunden. Fixiert und gefärbt wurden die Gele in einer alkoholischen Coomassie-Brilliantblau (R-250)-Lösung.

Tab. 2.2: Pipettierschema für 10 SDS-Gradientengele bzw. 2 Sammelgele

	Gradientengele (7-17 %)		Sammelgele (3%)
	Lsg. A	Lsg. B	
30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid	8750 μ l		400 μ l
30 % Acrylamid, 1,2 % Bisacrylamid		17500 μ l	
3 M Tris, pH 8,8	4375 μ l	4375 μ l	
0,5 M Tris, pH 6,8			1000 μ l
Glycerin		7000 μ l	
H ₂ O	21700 μ l	6000 μ l	2600 μ l
20 % SDS	175 μ l	175 μ l	20 μ l
5 % Ammoniumpersulfat	175 μ l	175 μ l	150 μ l
TEMED	8750 μ l	8,75 μ l	7 μ l

Probenpuffer

62,5 mM Tris-HCl , pH 6,8
2% SDS
5% β -Mercaptoethanol
10% Glycerin
0,005% Bromphenolblau

Laufpuffer

3,0 g/l Tris
14,4 g/l Glycin
1,0 g/l SDS

2.6 Western-Blot

Die nach der SDS-PAGE erhaltenen, ungefärbten Gele wurden nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) in einer *`semi-dry`* Fast-Blot-Apparatur im Sandwichverfahren zwischen je drei Lagen Blotpapier (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) für 90 min bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ auf eine Nitrocellulose-Membran ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$ Porengröße) geblottet. Dabei wurde das Blotpapier als Pufferreservoir eingesetzt, indem es zuvor mit dem unteren (0.3 M Tris, pH 10.4; 20 % Ethanol) bzw. oberen Transferpuffer (0.025 M Tris, pH 9.4; 20 % Ethanol; 0.04 M ϵ -Amino-Capronsäure) getränkt wurde. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Membran nach dem Blotten mit Ponceau-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) angefärbt.

Nach einer Block-Zeit von mind. 30 min in Blockmilch (5% Magermilchpulver in TBS: 20 mM Tris, pH 7.3; 150 mM NaCl) wurden die Membranen für zwei Stunden oder über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert. Für den Nachweis von HSP25 wurde dabei ein monospezifischer polyklonaler Kaninchen-anti-HSP25-Antikörper² (1:5000) und für den Nachweis von HSP70 der monoklonale anti-HSP70-Antikörper BRM-22 (Sigma, Deisenhofen, 1:7000) verwendet. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit TBS + 0,05 % Tween und dreimal mit TBS gewaschen und mit einem Alkalische-Phosphatase- (AP) konjugierten sekundären Antikörper (je nach primärem Antikörper entweder Anti-Kaninchen-IgG-AP- oder Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat von Promega, Madison, USA) für 90 min in Blockmilch inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS + 0,05 % Tween und TBS wurden die Membranen kurz mit H_2O und AP-Puffer (100 mM Tris, pH 9.5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl_2) gespült und danach die Nachweisreaktion mit dem Alkalische-Phosphatase-Reagenz von Promega (Madison, USA) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Farbreaktion wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt und die Membranen schließlich zwischen Filterpapier getrocknet.

2.7 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen kamen ein Philips EM400T (bei 80 kV Beschleunigungsspannung), ein Zeiss EM910 (bei 100 kV Beschleunigungsspannung) und ein Philips CM12 (bei 120 kV Beschleunigungsspannung) zum Einsatz. Alle Geräte sind mit Glühkathoden aus Wolfram als Elektronenquelle bestückt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer Nominalvergrößerung von 50.000 oder 60.000 auf Kodak 4489 Film (Kodak, Leverkusen) aufgenommen und nach Angaben des Herstellers mit D19-Entwickler entwickelt.

² Präparation 569, freundlicherweise von J. Stahl, MDC, zur Verfügung gestellt.

2.7.1 Negativkontrastierung

Bei der Negativkontrastierung handelt es sich um ein Verfahren zur Darstellung von Makromolekülen, bei dem die Moleküle in eine Lösung von stark streuenden Schwermetallsalzen eingebettet werden. Dadurch wird bei Bestrahlung mit Elektronen der Umriß des Partikels besonders deutlich und der Partikel selbst erscheint hell (negativ kontrastiert) im Vergleich zu seinem unmittelbaren Hintergrund. Die Proteinproben wurden auf eine Konzentration von ca. 100 µg/ml verdünnt und negativkontrastiert mit Hilfe der Doppelfilm-Technik mit 1 % Uranylformiat oder 2 % Uranylacetat (Behlke *et al.*, 1991). Der pH der Kontrastierungslösungen wurde nicht korrigiert.

2.7.2 Bildverarbeitung

2.7.2.1 Digitalisierung der Negative

Die für die Strukturanalyse ausgewählten Negative wurden mit einem Datacopy 610F Densitometer mit integrierter Beleuchtung und einem linearen CCD-Chip digitalisiert. Das Scannen erfolgte bei einer Pixelgröße von 22,8 µm im Negativ. Dies entspricht bei einer Vergrößerung von 60.000 im Negativ einer Pixelgröße von 0,38 nm im Objekt. Für die Partikelgrößenbewertung wurden die Negative mit einem EMil Densitometer (Image Science, Berlin) mit einer Auflösung von 1 nm in der Probenebene digitalisiert.

2.7.2.2 Strukturanalyse

Die Arbeiten zur Bildanalyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an VAX Workstations und IBM-PCs durchgeführt. Mit Hilfe des IMAGIC-5-Programmes (Image Science, Berlin) wurden zuerst iterativ ca. 3000 HSP25-Komplexe aus 25 eingescannten Bildern ausgesucht und die entsprechenden Bereiche als Einzelbilder in einer Datei gespeichert. Nach einer Band-Pass-Filterung (Frequenzen $< 1/85 \text{ \AA}$ und $> 1/15 \text{ \AA}$ wurden unterdrückt) erfolgte eine Normierung der Einzelbilder, um unterschiedliche Helligkeitsverteilungen innerhalb der Bilder auszugleichen. Anschließend wurden die Einzelbilder durch eine iterative Ausrichtung in Translationsebene auf der Basis einer rotationsgemittelten Referenz (erhalten aus der Summe des gesamten Datensatzes) zentriert. Dabei bedient man sich der sogenannten Kreuzkorrelationsfunktion (Saxton und Frank, 1977; van Heel *et al.*, 1992), für die die Bilddaten fouriertransformiert werden. Über das sogenannte 'Multi-Referenz-Alignment' wurde durch den Einsatz mehrerer Referenzen berücksichtigt, daß die Moleküle in verschiedenen Projektionsrichtungen liegen können. Die Unterscheidung der unterschiedlichen räumlichen Orientierungen wurde mit Hilfe der Multivariaten Statistischen Analyse (MSA) durchgeführt. Dabei wird durch die Beschreibung der Pixel als Koordinatenachsen über eine Eigenvektor-Eigenwert-Analyse die Datenmenge erheblich reduziert und über die

Varianz der Achsen ein Maß für die Unterschiede in den Bildern bereitgestellt (van Heel und Frank, 1981). Anschließend erfolgte die Klassifizierung der Bilder nach dem Kriterium der Intra-Klassen-Varianz (van Heel, 1984). Dabei wurde die Anzahl der Klassen vorher eingegeben. Nach der Klassifizierung der Bilder in verschiedene 'Ansichten' wurden die Bilder innerhalb einer Klasse gemittelt, wodurch sich das Signal/Rausch Verhältnis stark verbessert. Diese Arbeiten zur Strukturanalyse von HSP25-Komplexen wurden freundlicherweise von P. Dube (Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin) durchgeführt.

2.7.2.3 Partikelgrößenanalyse

Zur Auswertung der Partikelgrößenverteilung wurde das analySIS Bildauswertungsprogramm (Soft Imaging System GmbH, Münster) verwendet. Dazu wurden die eingescannten Bilder zunächst einer Shading-Korrektur unterzogen, mit einem Median-Filter geglättet und unter Verwendung eines geeigneten Schwellenwertes binarisiert. Die Partikel innerhalb eines $1 \mu\text{m}^2$ großen Bereiches wurden dann mit Hilfe eines Wasserscheiden-Algorithmus getrennt, anschließend detektiert und nach der Größe ihrer Fläche klassifiziert.

2.8 Hydrodynamische Methoden

Alle hydrodynamischen Untersuchungen erfolgten mit Hilfe analytischer Ultrazentrifugen vom Typ Model-E oder XL-A (Beckman, Palo Alto, USA) mit UV-Optik und photoelektrischem Scanner. Aus der wandernden Grenzschicht wurde der Sedimentationskoeffizient ($s_{20,w}$) und aus der Verbreiterung der Grenzschicht der Diffusionskoeffizient ($D_{20,w}$) ermittelt. Zusammen mit dem partiellen spezifischen Volumen \bar{n} (ermittelt aus der Aminosäurezusammensetzung und dem \bar{v}_i Inkrement der Aminosäuren) wurde die molekulare Masse (M) nach der Svedberg-Gleichung bestimmt

$$M = \frac{s \cdot R \cdot T}{D(1 - r \cdot \bar{n})} \quad (\text{Gleichung 1})$$

mit R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur und ρ = Dichte des Lösungsmittels.

Für die Analyse der HSP25-Komplexe wurde ein \bar{v} von $0,7447 \text{ ml/g}$ verwendet (statt $\bar{v} = 0,7326$ für reines HSP25), da sie langkettige Fettsäuren enthalten (Oesterreich *et al.*, 1991a). Die Sedimentations- und Diffusionskonstanten lassen außerdem die Bestimmung des Reibungsverhältnisses f/f_0 zu, das Hinweise zur Form der Komplexe liefert

$$f/f_0 = 10^{-8} \left(\frac{1 - r \bar{n}}{D^2 \cdot s \cdot \bar{n}} \right)^{1/3} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Nimmt man eine Kugel-förmige Gestalt der HSP25 Moleküle an, kann der Radius der Monomere nach folgender Formel berechnet werden

$$r = \left(\frac{3M \cdot \bar{n}}{4\rho \cdot N_A} \right)^{1/3} \quad (\text{Gleichung 3})$$

mit N_A = Avogadro-Zahl.

Die Sedimentations-Koeffizienten von HSP25-Komplexen (s_n) wurden aus den Sedimentations-Koeffizienten der Monomere (s_1) und der Assoziationszahl (n) nach Gleichung 4 errechnet

$$s_n = s_1 \cdot n^{2/3} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Wenn die Assoziante Mitglieder einer polymer homologen Reihe sind, kann Gleichung 5 angewendet werden

$$s = k_s \cdot M^{a_s} \quad (\text{Gleichung 5})$$

in der die Werte der Konstanten k_s und a_s von der Natur des Lösungsmittels, der Konformation des polymeren Moleküls in dem Lösungsmittel und dem Grad der Durchdringung des Komplexes mit dem Lösungsmittel abhängen.

Für die Modell-abhängige Berechnung der hydrodynamischen Parameter der HSP25-Komplexe wurde das Programm HYDRO (Garcia de la Torre *et al.*, 1994) eingesetzt. Die mit diesem Programm errechenbaren Konstanten basieren auf der vereinfachten Annahme einer kugelförmigen Gestalt der einzelnen Moleküle. Wenn deren Radien und kartesische Koordinaten sowie das Molekulargewicht, der Auftriebsterm, die Viskosität des Lösungsmittels und die Temperatur bekannt sind, können die Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten abgeschätzt werden. Durch Variationen in dem Arrangement der Kugeln wurde ein Modell abgeleitet, bei dem die theoretischen und experimentellen hydrodynamischen Daten gut übereinstimmen.

Die Ultrazentrifugen-Experimente wurden bei einer Protein-Konzentration von 0,4 mg/ml in Puffer H (2 mM Tris-HCl, pH 7,5; 20 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,2 mM Na₂ATP; 0,5 mM β -ME) bei 20°C durchgeführt. Die Wanderung der Grenzschicht wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet. Die Rotorgeschwindigkeit betrug 6.000 U/min für die Diffusions- und 20.000, 30.000 oder 40.000 U/min für die Sedimentations-Experimente.

Die Komplex-Bildung von G-Actin mit Peptiden von kHSPs wurde mittels der Sedimentations-Gleichgewichts-Technik analysiert. Dafür wurden 70 μ l G-Actin oder verschiedene Mischungen von Peptiden mit G-Actin in Puffer D in die einzelnen Kammern von Sechska-

nal-Zellen gefüllt und zunächst für 2 h bei 30.000 U/min (*over speed*) und anschließend für 22 h bei 10°C und 26.000 U/min (Gleichgewichtsgeschwindigkeit) zentrifugiert. Die radialen Konzentrationsverteilungen wurden bei drei verschiedenen Wellenlängen, meistens bei 280 nm, 285 nm und 290 nm aufgezeichnet. Die molekularen Massen von G-Actin und der Komplexe aus G-Actin und Peptid wurden durch die Anpassung der Konzentrationsverteilungen nach dem Verfahren von Behlke und Ristau (1997) berechnet. Die molekulare Masse der Peptide in Puffer D wurde aus den Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten berechnet wie bei Behlke und Ristau (1997) beschrieben und die partiellen spezifischen Volumina wurden anhand der Aminosäurezusammensetzung der Proteine ermittelt.

2.9 Fluoreszenzspektroskopie

Actin kann durch eine Reaktion mit N-(1-Pyrenyl)-Jodacetamid an Cystein 374 mit Pyren markiert werden (Kouyama und Mihashi, 1981). Das Fluoreszenzspektrum von Pyrenyl-Actin ändert sich drastisch bei der Polymerisation von G-Actin zu F-Actin, so daß bei einer entsprechenden Wahl der Emissionswellenlänge ein bis zu 20-facher Anstieg im Fluoreszenz-Signal beobachtet werden kann (Cooper *et al.*, 1983). Dies erlaubt eine ausgezeichnete Beobachtung der Polymerisations-Depolymerisations-Dynamik durch zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenz in einem Fluoreszenzphotometer. Alle Messungen wurden an einem Shimadzu RF5001PC Spectrofluorometer (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) mit temperaturkontrolliertem Küvettenhalter durchgeführt und mit der dazugehöriger Software im *Labtime*-Modul an einem PC aufgezeichnet.

Im Standard-Polymerisations-Assay wurden die Komponenten in einer Mikro-Fluoreszenz-küvette (Hellma, 3 x 3 x 6 mm) zu einem Gesamtvolumen von 60 µl vermischt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden dabei zunächst 44 µl Puffer D in der Küvette vorgelegt, dann 5 µl Pyrenyl-Actin (Endkonzentration 2 µM) und verschiedene Mengen der zu testenden Substanz in 5 µl Puffer D hinzugegeben und für 3 min bei 25°C vorinkubiert. Der Start der Polymerisation wurde durch die Zugabe von 1 µl Actin-Keimen (Endkonzentration 0,2 µM) und 5 µl einer Salzlösung (600 mM KCl, 24 mM MgCl₂) ausgelöst. Die Aufzeichnung des Reaktionsverlaufes wurde nach gründlichem Mischen innerhalb von 10 Sekunden nach der Salzzugabe gestartet. Registriert wurde das emittierte Licht mit einem auf 407 nm eingestellten Filter (10 nm Fenster) nach einer Anregung bei 365 nm (5 nm Fenster) bei einem Meßabstand von 2 Sekunden über 10 min.

Für die Berechnung der Stöchiometrie der Hemmung wurden die Steigungen der Kurven während der ersten 5 Minuten (im linearen Bereich des Anstieges) anhand der linearen Regression ermittelt und in Prozent Hemmung der Actinpolymerisation im Vergleich zur Kontrolle umgerechnet.

2.10 Peptid-Synthese

Alle Peptide wurden von der Firma BioTeZ, Berlin, bezogen. Sie wurden mit Hilfe der simultanen multiplen Festphasen-Peptidsynthese an einem PSSM-8 Automaten (Shimadzu, Kyoto, Japan) unter Verwendung der Fluorenyl-Methoxycarbonyl (Fmoc)-Strategie nach Sheppard (Atherton und Sheppard, 1989) hergestellt. Die Peptide wurden mittels HPLC bis zu einer Reinheit von 85-95% aufgereinigt und an einem MALDI I Massenspektrometer (Kratos, Manchester, England) charakterisiert (Karas und Hillenkamp, 1988). Alle Peptid-Amide waren N-terminal acetyliert und lagen bei Lieferung als Lyophilisat vor. Sie wurden eingewogen und mit einer Soll-Konzentration von 2 mM in H₂O gelöst. Die genauen Konzentrationen dieser wäßrigen Peptid-Lösungen wurde mit Hilfe einer Aminosäureanalyse im Labor von B. Wittmann-Liebold (MDC, Berlin) durch G. Grelle bestimmt. Dazu wurden die Peptide zunächst in 6 N HCl mit 7% Thioglycolsäure als Additiv (Yokote *et al.*, 1986) für 24 h bei 110°C einer Dampfphasen-Hydrolyse unterzogen (Meltzer *et al.*, 1987). Die getrockneten Hydrolysate wurden anschließend in Natriumcitrat-Puffer (0,15 M, pH 2,2) aufgenommen. Die Trennung der einzelnen Aminosäuren mittels Kationentauscher-Säule, die anschließende Derivatisierung mit Orthophtaldialdehyd (OPA) und der Nachweis mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors erfolgte in einem Sykam-Analysator (Sykam, Gilching). Durch eine anschließende Aufnahme von Spektren im Ultraviolett- (UV) Bereich des Lichtes wurden außerdem die Extinktionskoeffizienten der Peptid-Lösungen bestimmt, um eine Kontrolle der Konzentrationen nach Verdünnungen oder erneuter Einwaage zu ermöglichen.

2.11 Peptid-Epitop-Scanning

Zellulose-gebundene Peptid-Bibliotheken (Peptidmembranen) von murinem HSP25 und humanem α -Skelettmuskel-Actin wurden mit Hilfe der automatischen Spot-Synthese (Frank, 1992; Kramer *et al.*, 1994) bei der Fa. Jerini BioTools GmbH (Berlin) synthetisiert. Die direkt an der Membran synthetisierten Peptide waren je 13 Aminosäure lang und überlappten mit der Sequenz des Folgepeptids an 11 Positionen. Daraus ergeben sich für HSP25 99 und für Actin 182 Punkte (Spots) auf den Peptidmembranen. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide sind in Tab. 7.2 und 7.3 im Anhang aufgelistet. Für die Analyse der Bindungsaktivitäten wurden die Peptidmembranen für 150 min bei Raumtemperatur mit nativem HSP25 bzw. G-Actin (200 μ g/ml) in Puffer S (20 mM Tris, pH 7.4; 5% Glycerin; 0.05 % Tween; 5 % Sucrose; 0.5 mM EDTA; 1 mM DTE; 1 mM Benzamidin; 1 x Blocking Reagenz (Genosys, England)) inkubiert. Anschließend wurden sie bei 4 °C zweimal kurz mit Puffer S gewaschen und die gebundenen Proteine direkt auf der Membran nachgewiesen. Für die Detektion von HSP25 wurde der monospezifische Kaninchen-anti-HSP25 Antikörper (1:1000, vgl. Kapitel 2.6) und für die Detektion von Actin ein Maus-anti-Actin-Antikörper (Clone C4, 1:100,

Boehringer, Mannheim) eingesetzt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit einem Meerrettich-Peroxidase- (HRP) konjugierten sekundären Antikörper und einem HRP-Detektions-Kit.

2.12 Sequenzdaten

Alle Proteinsequenzen wurden der SwissProt Proteindatenbank entnommen. Computerunterstützte Alignierungen von Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Programms MSA (Lipman *et al.*, 1989) oder FASTA (Pearson und Lipman, 1988) durchgeführt. Proteinparameter wie Aminosäurezusammensetzung oder theoretisches Molekulargewicht wurden mit dem Programm PROTPARAM berechnet. Auf alle Programme wurde über das WWW (World Wide Web) zugegriffen.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von HSP25

Die Isolierung von HSP25 erfolgte in Anlehnung an Benndorf *et al.* (1992) aus EAT-Zellen der Maus in der stationären Wachstumsphase (Bielka *et al.*, 1994; Benndorf *et al.*, 1988a). Dabei wurde besonderes Augenmerk auf eine schonende Behandlung der Präparate gelegt, um das Protein in möglichst nativer Form zu gewinnen. Die Isolierung erfolgte über eine Ammoniumsulfatpräzipitation und drei Chromatographieschritte. Nach dem Zellaufschluß wurden die EAT-Zellextrakte schockgefroren und für die weitere Aufreinigung dann pro Präparation ca. 50 ml aufgetaut. Die Fällung mit Ammoniumsulfat erfolgte bei einer Sättigung von 45%. Bei der anschließenden Dialyse des Niederschlags zeigte sich, daß nicht mehr alle Proteine in Lösung gingen. Die elektrophoretische Analyse dieser unlöslichen Komponenten ergab, daß es sich dabei um Fremdproteine handelte. Durch Abzentrifugation des Dialysates wurden diese Aggregate entfernt und damit ein zusätzlicher Reinigungseffekt erzielt. Der erste Chromatographieschritt bestand in einer Auftrennung des Dialysats über eine DEAE52-Säule. Zur Elution wurde ein Gradient von 0-250 mM NaCl verwendet (Abb. 3.1 A). Benndorf *et al.* (1994) verwendeten bei der Reinigung von HSP25 aus EAT-Zellen an dieser Stelle eine Phenylsepharose-Säule, die die Verwendung von Triton X-100, einem starken Detergens, notwendig macht. Da Triton X-100 eine Veränderung der nativen Struktur der HSP25-Komplexe bewirken könnte und Vorversuche zeigten, daß sie nur wenig effektiv bei der Reinigung von HSP25 ist, wurde hier auf diese Säulenart verzichtet. Die HSP25-haltigen Fraktionen aus der DEAE52-Elution wurden dialysiert und auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen. Unter den in Kapitel 2.1.4 beschriebenen Bedingungen bindet HSP25 nicht an die Säule und wird damit von den Proteinen abgetrennt, die eine Affinität zu dem Säulenmedium aufweisen (Abb. 3.1 B).

Aus Vorversuchen mit alternativen Säulen ergab sich, daß eine weitere Aufreinigung von HSP25 mittels einer Chromatofokussierung über eine Mono P-Säule zwar sehr effektiv ist, daß aber nach diesem Präparationsschritt kaum noch supramolekulare Komplexe vorhanden waren und daß das Protein die Actinpolymerisation nicht hemmte. Anschließende Analysen mittels zweidimensionaler SDS-PAGE (nicht gezeigt) belegten, daß das auf diese Weise gewonnene Material überwiegend unphosphoryliertes HSP25 war, das nach den Befunden von Benndorf *et al.* (1994) einen hemmenden Einfluß auf die Actinpolymerisation haben sollte. Da das Protein bei der Chromatofokussierung im Bereich des isoelektrischen Punktes ($pI = 6,12$) von der Säule gewaschen wird, ist es möglicherweise denaturiert. Es wurde deshalb auf die Mono P-Säule verzichtet und statt dessen im Anschluß an die Hydroxylapatit-Säule eine Mono Q-Säule eingesetzt. Dies hatte zusätzlich den Vorteil, daß die Proben vor dem Lauf nicht erneut dialysiert werden mußten. Die Elution der Proteine von der Mono Q-Säule erfolgte mit einem Gradienten von 0-400 mM NaCl, die HSP25-haltigen Fraktionen wurden bei 100-200 mM NaCl eluiert (Abb. 3.1 C).

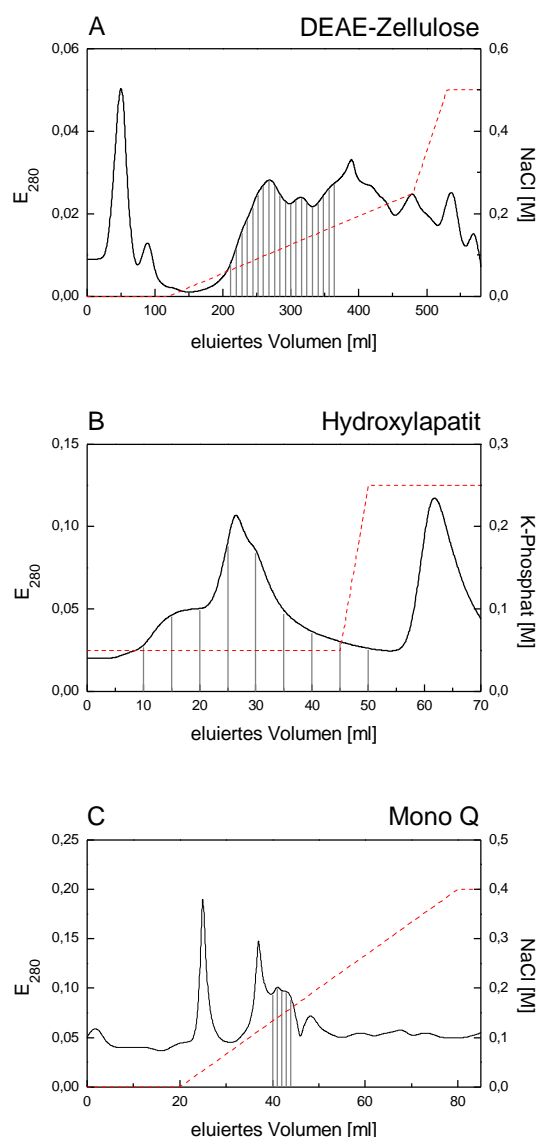


Abb. 3.1: FPLC-Chromatogramme der Aufreinigungsschritte des nativen HSP25

Trennung der Präparate nach: A, DEAE52-Säule; B, Hydroxylapatit-Säule; C, Mono Q-Säule. In den Elutionsprofilen sind die Absorption der Eluate bei 280 nm (—) und der Verlauf des Gradienten (---) aufgezeichnet. Die gekennzeichneten Flächen im Elutionsprofil markieren die zur weiteren Aufreinigung verwendeten Fraktionen. Dabei entspricht jede senkrechte Linie einer Fraktion.

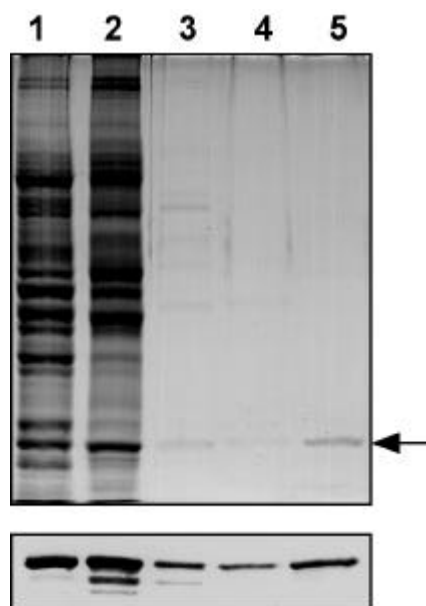
Abb. 3.2 zeigt den Fortgang der Aufreinigung anhand der Proteinmuster der einzelnen Reinigungsschritte. Die Identifizierung von HSP25 mit Hilfe des monospezifischen Antikörpers ist ebenfalls in Abb. 3.2 dargestellt. Die in dem Western-Blot erkennbaren Unterbanden stellen vermutlich Abbauprodukte von HSP25 dar. Sie sind nach der Hydroxylapatit-Säule nicht mehr zu erkennen. Nach der Reinigung über die Mono Q-Säule ist auf dem SDS-Gel nur noch eine Bande bei ca. 25 kDa zu erkennen. Damit gelang es, HSP25 mit nur drei Chromatographieschritten in einem elektrophoretisch sauberen Zustand zu isolieren. Tab. 3.1 zeigt die Bilanz einer repräsentativen Präparation. HSP25 wurde im Vergleich zum EAT-Lysat ca. 55-fach

Tab. 3.1: Bilanz einer repräsentativen HSP25-Präparation

Eine typische Präparation umfaßte etwa 8×10^9 EAT-Zellen.

Reinigungsschritt	Proteinmenge (mg)	Reinigungsfaktor	Ausbeute (%)
EAT-Lysat	175	1	100
Ammoniumsulfat-Fällung	64	3	44
DEAE 52	14,4	4	35
Hydroxylapatit	1,4	20	8
Mono Q	0,4	55	5

angereichert. Dieser Reinigungsfaktor besagt indirekt, daß HSP25 in EAT-Zellen der stationären Wachstumsphase etwa 1,8% des Gesamtproteins ausmacht. Dies steht in guter Übereinstimmung mit älteren Daten, nach denen HSP25 als eines der prominentesten Proteine in Ehrlich-Ascites-Tumoren dieses Stadiums ca. 1% der Zellproteine umfaßt (Benndorf *et al*, 1988a). Der Einfluß des nach diesem Schema isolierten HSP25 auf die *in vitro* Actinpolymerisation wird in Kapitel 3.3.1 behandelt. Eine weitere Auftrennung der in dieser Präparation enthaltenen unterschiedlich großen supramolekularen Komplexe mittels Zentrifugation über einem Saccharosekissen (Kapitel 2.1.6) bildete die Basis für Strukturanalysen mittels Elektronenmikroskopie und hydrodynamischen Methoden (siehe Kapitel 3.2.1).

**Abb. 3.2: Proteinmuster der Proben und Nachweis von HSP25 nach den einzelnen Reinigungsschritten**

SDS-PAGE (oben) und Western-Blot (unten) der Präparate nach der Lyse der EAT-Zellen (Bahn 1), Ammoniumsulfat-Fällung (Bahn 2), DEAE-Zellulose-Säule (Bahn 3), Hydroxylapatit-Säule (Bahn 4) und Mono Q-Säule (Bahn 5). Der Pfeil markiert die Position der HSP25-Bande.

3.2 Struktur von HSP25

3.2.1 Natives HSP25

3.2.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Das aus EAT-Zellen isolierte HSP25 enthält sowohl niedermolekulares Material als auch HSP25-Komplexe verschiedener Größe. Die hochmolekularen HSP25-Komplexe konnten von den HSP25-Monomeren (Überstand oder Fraktion 1) wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben abgetrennt werden. Die Komplexe bestanden jedoch nicht aus einer einheitlichen Fraktion, sondern aus mindestens drei verschiedenen Größenklassen. Diese wurden mittels einer Sepharose 6B-Säule voneinander getrennt, so daß insgesamt vier Fraktionen untersucht wurden. Bei der elektronenmikroskopischen Analyse negativkontrastierter Präparate dieser Fraktionen ergab sich das folgende Bild: Der Überstand (Fraktion 1) enthält nur niedermolekulares Material (Abb. 3.3 A), hochmolekulare Komplexe waren nicht zu erkennen. Die anderen, durch Säulenchromatographie aufgetrennten Fraktionen, unterschieden sich kaum in ihrem elektronenmikroskopischen Erscheinungsbild. Sie beinhalten ringförmige Komplexe mit einem Durchmesser von ca. 16 nm, in deren Mitte (ca. 8 nm im Durchmesser) eine Anreicherung von Kontrastmittel zu erkennen ist (Abb. 3.3 B). Die Ablagerung von Kontrastmittel in diesem zentralen Bereich läßt auf eine Vertiefung oder einen Hohlraum schließen, wobei der Kontrastierungsgrad dieser Struktur deutlich variierte.

Um eine genauere Vorstellung von der Feinstruktur dieser Komplexe gewinnen zu können, wurde eine Bildanalyse mit Hilfe des Programmes IMAGIC-5 durchgeführt. Die resultierenden Klassenmittel, die verschiedenen Ansichten der HSP25-Komplexe entsprechen, sind in Abb. 3.4 A gezeigt. Diese Ansichten weisen ein rundes, ringförmiges Profil mit uneinheitlich strukturiertem Zentrum auf. Die Klassenmittel aus der mittleren Reihe erscheinen dabei etwas kompakter als die anderen Ansichten. Die während der MSA (Multivariate Statistische Analyse) generierten Eigen-Bilder deuten auf eine vierfache, zweifache und zum Teil auch achtfache Symmetrie der HSP25-Komplexe hin (siehe Abb. 3.4 B). Dabei stellt das erste Eigen-Bild die Summe des alignierten Datensatzes dar, wohingegen die folgenden drei eine leichte Kippung der Moleküle zum Untergrund, also der Trägerfolie, widerspiegeln. Aufgrund einer bevorzugten Orientierung der Komplexe wurden sehr viele 'Ansichten' von oben und nur wenige von der Seite gefunden. Darum konnte auf der Basis dieser Daten eine dreidimensionale Struktur nicht berechnet werden. Die Punktgruppensymmetrie der HSP25-Komplexe konnte nicht zweifelsfrei ermittelt werden, jedoch wird aus dem vorhandenen Datensatz deutlich, daß im Falle des nativen HSP25 die Komplexe eine ringförmige Struktur aufweisen und keine dicht gepackten Assoziate bilden, wie sie für rekombinantes HSP25 beschrieben wurden (Behlke *et al.*, 1991).

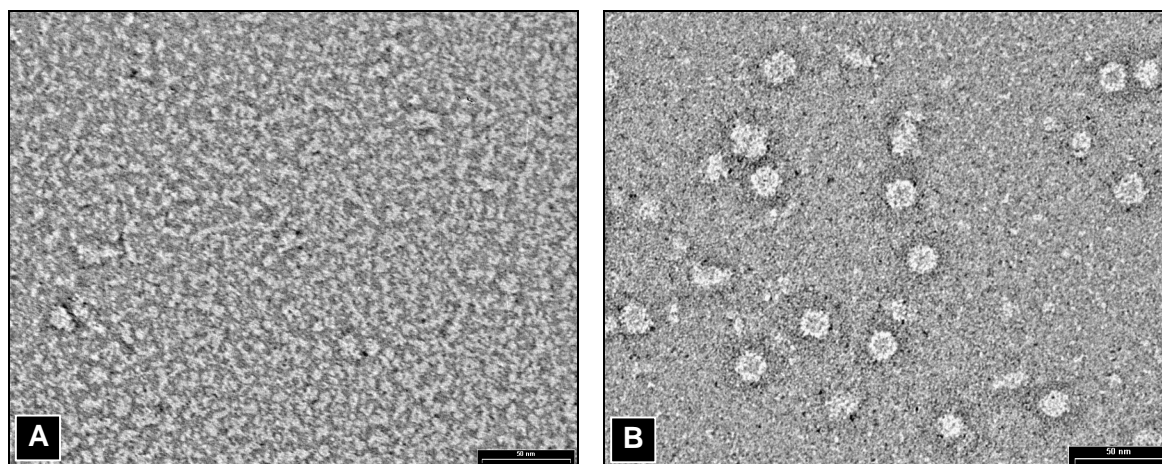


Abb. 3.3: Elektronenmikroskopische Darstellung von nativem HSP25

A, niedermolekulares HSP25. B, HSP25-Komplexe. Die Meßbalken weisen eine Länge von 50 nm auf. Vergrößerung 235.000 x.

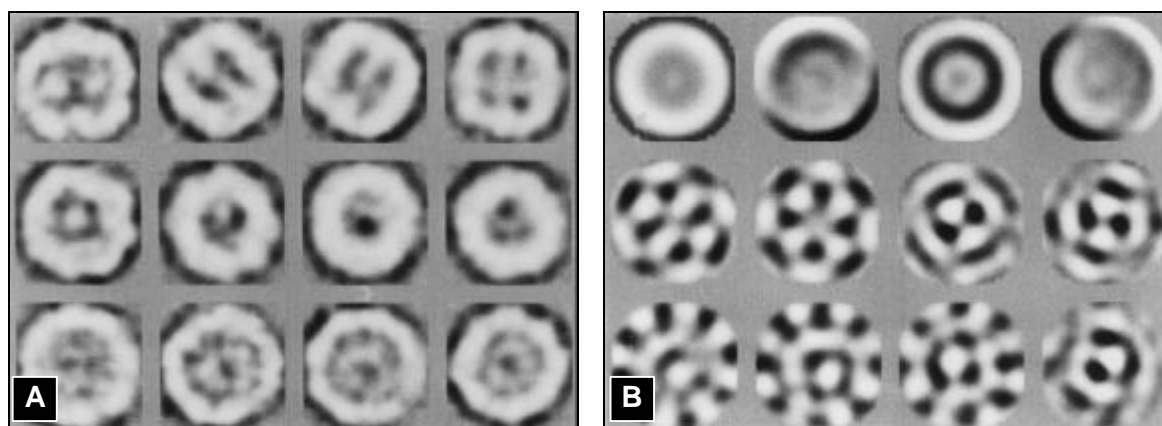


Abb. 3.4: Ergebnisse der Strukturanalyse der negativ kontrastierten HSP25-Komplexe

A, Galerie charakteristischer Ansichten von HSP25-Komplexen. Die Ansichten entsprechen aufsummierten und gemittelten Einzelbildern. B, Die ersten 12 Eigen-Bilder, die bei der Bildverarbeitung generiert wurden. Die Symmetrie-Eigenschaften des Datensatzes treten in der mittleren und unteren Reihe zutage.

3.2.1.2 Hydrodynamische Untersuchungen

Die verschiedenen HSP25-Fractionen, die nach der Zentrifugation und abschließenden Chromatographie über eine Sepharose 6B-Säule erhalten wurden, wurden wie in Kapitel 2.8 geschildert mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Der Überstand (Fraktion 1) enthielt in Übereinstimmung mit der elektronenmikroskopischen Analyse nur niedermolekulares Material, das durch einen Sedimentationskoeffizienten von 2,5 S und einen Diffusionskoeffizienten von $10,1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ gekennzeichnet ist (Abb. 3.5 A). Unter Verwendung der Svedberg-

Gleichung konnte für diese Fraktion ein Molekulargewicht von 23 kDa ermittelt werden. Dies stimmt gut mit dem aus der Aminosäurezusammensetzung ermitteltem Wert für HSP25 überein (23.014 Dalton) und läßt darauf schließen, daß der Überstand monomeres HSP25 enthält. Das Reibungsverhältnis von 1,126 (siehe Gleichung 2 in Kapitel 2.8) belegt die annähernd kugelförmige Gestalt der HSP25-Monomere. Unter Kenntnis des Molekulargewichtes und des partiellen spezifischen Volumens von HSP25 kann für diese Moleküle ein Radius von etwa 1,9 nm angenommen werden.

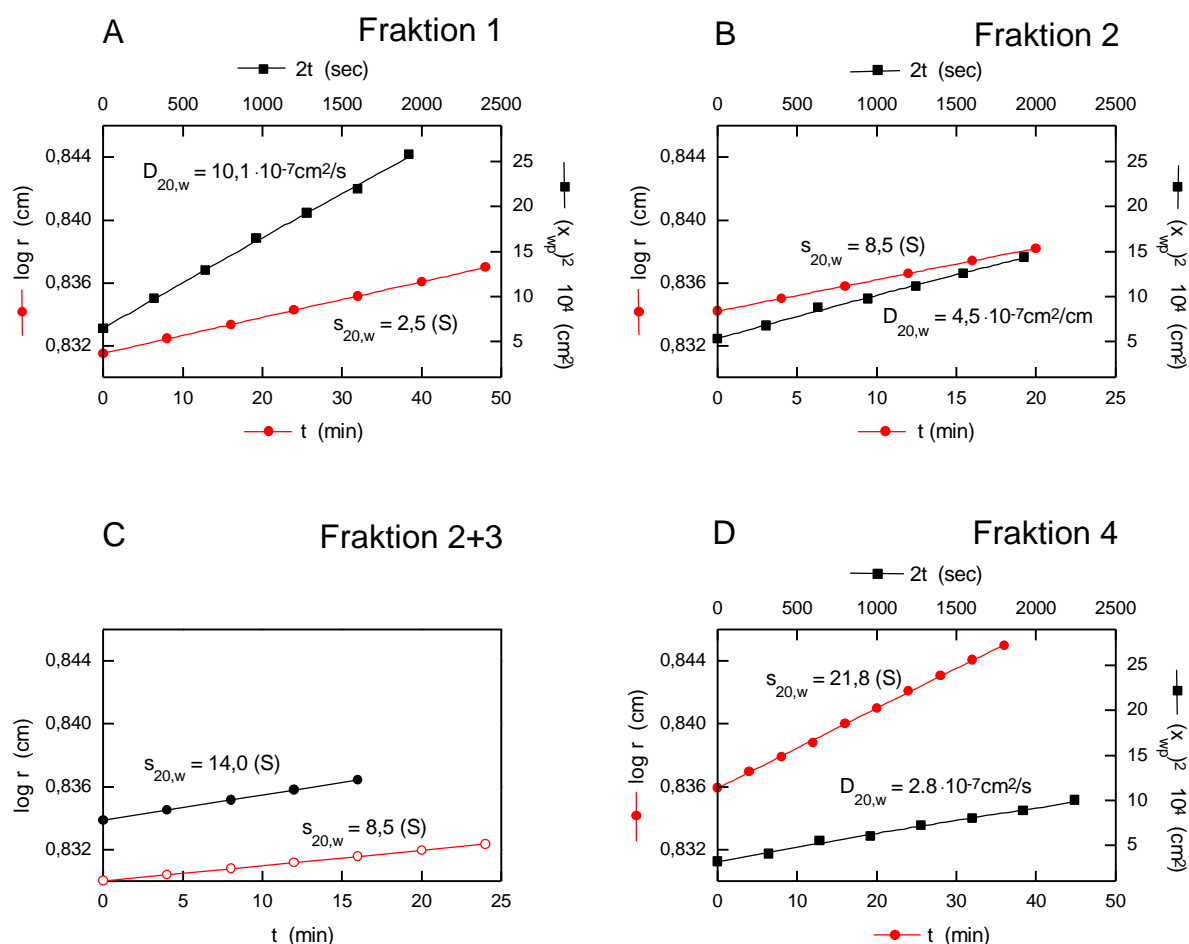


Abb. 3.5: Grafiken zur Bestimmung der Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten

Alle Diffusionsexperimente wurden bei einer Drehzahl von 6.000 U/min durchgeführt. X_{WP} steht für den Betrag der Verbreiterung der wandernden Grenzschicht am 16 bzw. 84%-Wert des Plateaus. A, Bestimmung des Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten des Überstands der HSP25-Präparation. Die Rotorgeschwindigkeit für die Sedimentation betrug 40.000 U/min. B, Bestimmung des Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten von Fraktion 2. Die Rotorgeschwindigkeit für die Sedimentation betrug 30.000 U/min. C, Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten von Fraktion 2 (○) und 3 (●). Die Trennung der beiden Fraktionen war nach ca. 50 min möglich. Die Rotorgeschwindigkeit betrug 20.000 U/min. D, Bestimmung des Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten von Fraktion 4. Die Rotorgeschwindigkeit für die Sedimentation betrug 20.000 U/min.

Für die mittels Säulenchromatographie partiell getrennten Fraktionen wurden die folgenden Ergebnisse erzielt. Fraktion 2 weist einen Sedimentationskoeffizienten von 8,5 S und einen Diffusionskoeffizienten von $4,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ auf (Abb. 3.5 B). Daraus geht eine molekulare Masse von ca. 180 kDa hervor, was etwa dem achtfachen Wert der HSP25-Monomere entspricht. Von Fraktion 3 konnte nur eine geringe Menge isoliert werden. Aus diesem Grund war eine Bestimmung des Diffusionskoeffizienten nicht möglich. Diese Fraktion wies einen Sedimentationskoeffizienten von 14,0 S auf (Abb. 3.5 C). Ein Vergleich der Sedimentationskoeffizienten von Fraktion 2 und 3 (nach Gleichung 4 in Kapitel 2.8) deutet darauf hin, daß das Material aus Fraktion 3 Dimeren der Fraktion 2 entspricht. Fraktion 4 ist gekennzeichnet durch einen $s_{20,w}$ -Wert von 21,8 S und einem $D_{20,w}$ -Wert von $2,8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Abb. 3.5 D). Die resultierende molekulare Masse von 740 kDa übersteigt diejenige des monomeren HSP25 32-mal. Die HSP25-Komplexe scheinen Mitglieder einer polymer homologen Reihe (vgl. Gleichung 5 in Kapitel 2.8) mit einem k_s -Wert von $2,56 \times 10^{-3} \text{ S} \times \text{Mol/g}$ und einem a_s -Wert von 0,67 zu sein, was für globuläre Komplexe spricht (Cox, 1969). Im Vergleich zu den HSP25-Monomeren sind die Sedimentationskoeffizienten der Komplexe jedoch zu klein. Die ringförmige Struktur, wie sie im vorherigen Abschnitt durch die elektronenmikroskopische Auswertung ermittelt wurde, könnte diese Diskrepanz erklären, denn das größere Oberflächen/Volumen-Verhältnis der ringförmigen Komplexe bedingt ein im Vergleich zur kompakten Kugelform der Monomere relativ kleinen $s_{20,w}$ -Wert.

3.2.1.3 Ableitung eines Strukturmodells für natives HSP25

Auf der Basis der elektronenmikroskopischen und hydrodynamischen Daten wurde versucht, die Struktur der multimeren Komplexe des nativen HSP25 zu modellieren. Mit Hilfe des Programmes HYDRO (Garcia de la Torre *et al.*, 1994) und unter Verwendung von vorgegebenen Daten für die Molmasse der Komplexe, der Anzahl, Größe und Koordinaten der Monomere sowie des Auftriebsterms wurden verschiedene Anordnungen der Monomere (angenommener Radius = 1,9 nm) konstruiert. Neben anderen Parametern wurden mit diesem Programm auch die theoretischen Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten für die jeweiligen Modelle ermittelt. Eine gute Übereinstimmung der theoretischen mit den experimentell ermittelten Werten konnte mit einem Modell erreicht werden, bei dem die Komplexe aus gestapelten Ringen mit je acht Monomeren bestehen. In Abb. 3.6 sind die Monomere und die Modell-Komplexe aus je einem, zwei oder vier Ringen mit den für sie berechneten Parametern dargestellt und den experimentell ermittelten Werten der vier Fraktionen gegenübergestellt. Das Vier-Ring-Modell repräsentiert den Aufbau der Komplexe aus der vierten Fraktion und entspricht der vorherrschenden Form der nativen Komplexe. Es ist gekennzeichnet durch einen Sedimentationskoeffizienten von 22 S, einen Diffusionskoeffizienten von 2,9 F und ein Molekulargewicht von 736 kDa bei einem Durchmesser von 14 nm und einer Höhe von 16 nm (Behlke *et al.*, 1995).

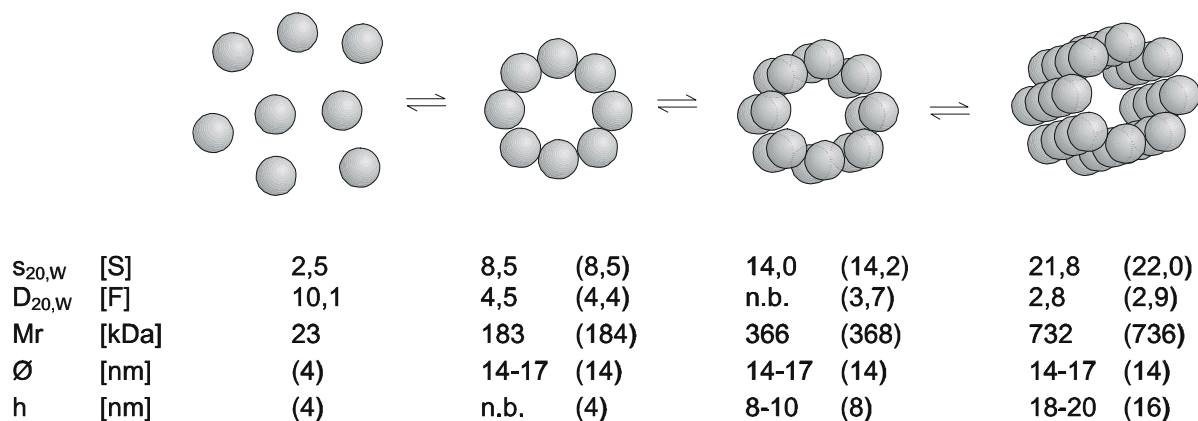


Abb. 3.6: Strukturmodell für die aus EAT-Zellen aufgereinigten HSP25-Komplexe

Modelle der dreidimensionalen Struktur der HSP25-Komplexe mit den dazugehörigen experimentell (ohne Klammern) und rechnerisch (in Klammern) bestimmten Parametern. Die Dimension [F] steht für $10^{-7}\text{cm}^2/\text{s}$, \emptyset für Durchmesser und h für Höhe. n.b. = nicht bestimmt.

3.2.2 Rekombinantes HSP25 und HSP25-Mutanten

Im Labor von M. Gaestel (MDC, Berlin) wurden in *E. coli* neben den Wildtypen (wt) die folgenden Mutanten des murinen und des menschlichen HSP25 kloniert und isoliert:

- 1.) HSP25- Δ C18: C-terminal um 18 Aminosäuren verkürztes HSP25 der Maus
- 2.) HSP25-S15D: menschliches HSP25 mit Aspartat statt Serin an Position 15
- 3.) HSP25-S15,78D: menschliches HSP25 mit Aspartat statt Serin an Position 15 und 78
- 4.) HSP25-S15,78,82D: menschliches HSP25 mit Aspartat statt Serin an Position 15, 78 und 82

Die stufenweise Ersetzung der phosphorylierbaren Serine 15, 78 und 82 durch Aspartate wurde vorgenommen, um eine Phosphorylierung an diesen Positionen zu imitieren. Darüber hinaus wurde zum Vergleich das menschliche Wildtyp-Protein *in vitro* mit Hilfe der MAPKAP-Kinase 2 vollständig phosphoryliert (HSP25-P). Alle rekombinanten HSP25- Präparate wurden hinsichtlich des Assoziationsgrades der Komplexe untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Hier wurden die Elektronenmikroskopie und ein Bildauswertungsverfahren zur Quantifizierung der Partikelgrößen eingesetzt.

3.2.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden mit dem HSP25-Wildtyp und der HSP25- Δ C18-Mutante der Maus sowie dem HSP25-Wildtyp, der S15D-Mutante, der S15,78D-Mutante, der S15,78,82D-Mutante und dem *in vitro* phosphorylierten HSP25-Wildtyp des Menschen durchgeführt. Die Komplexe beider HSP25-Wildtypen erscheinen nach Negativkontrastierung als mehr oder weniger globuläre Komplexe mit ca. 15 bis 20 nm Durchmesser (Abb. 3.7 A und Abb. 3.8 A). Nur ein sehr geringer Teil der Komplexe ist kleiner als 10 nm. Die Komplexe der Δ C18-Mutante ähneln denen des Wildtyps. Lediglich die Größenverteilung der Komplexe erscheint hier etwas uneinheitlicher (Abb. 3.7 B). Damit wird klar, daß der C-terminale Teil der Proteins keinen entscheidenden Einfluß auf die Quartärstruktur der Komplexe besitzt. Im Präparat der S15D-Mutante (Abb. 3.8 B) sind die Komplexe im Vergleich zum Wildtyp etwas unregelmäßiger im Umriß und es erscheinen mehr kleinere Komplexe. Dem sehr ähnlich stellt sich das Präparat der S15,78D-Mutante dar (Abb. 3.8 C). Die Tendenz zur Ausbildung kleiner Komplexe setzt sich bei dieser Mutante fort. Im Falle der Dreifach-Mutante S15,78,82D (Abb. 3.8 D) sind die Komplexe deutlich kleiner. Die Mehrzahl hat nur noch einen Durchmesser von 5 bis 10 nm. Lediglich vereinzelte Komplexe weisen die gleiche Größe wie diejenigen des Wildtyps auf. Auffällig sind die vielen länglichen Strukturen in diesem Präparat, möglicherweise eine spezielle Form der HSP25-Komplexe. Nahezu das gleiche Bild ergibt sich bei dem Präparat des *in vitro* phosphorylierten Wildtyps (Abb. 3.8 E). Auch hier sind hauptsächlich kleine Komplexe und nur wenige mit 15 bis 20 nm Durchmesser zu finden. Diese Daten zeigen eindeutig, daß der Phosphorylierungszustand die Größenverteilung der HSP25-Komplexe beeinflusst. Die Tendenz zur Ausbildung kleinerer Komplexe wird dabei schon durch den Austausch eines Serins erkennbar, aber erst bei der vollständigen Mutagenese aller phosphorylierbaren Reste, bzw. der vollständigen Phosphorylierung des Wildtyp-Proteins, wird die Ausbildung der hochmolekularen Komplexe nahezu vollständig unterbunden.

Daß die Dreifach-Mutante denselben Phänotyp zeigt wie der phosphorylierte Wildtyp, belegt eindrucksvoll die gelungene Imitation der Phosphorylierung durch den Austausch der Serine in Aspartate. Diese Befunde belegen die Bedeutung der Phosphorylierung für die Quartärstruktur von HSP25 und sprechen damit für eine Regulation der Funktion von HSP25 über die supra-molekulare Organisation.

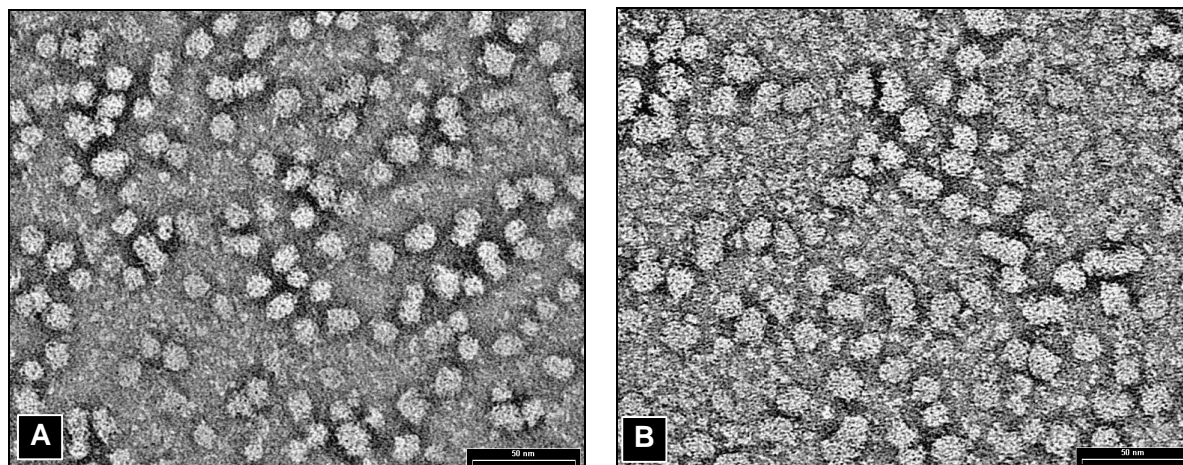


Abb. 3.7: Elektronenmikroskopische Darstellung von rekombinantem murinem HSP25

A, HSP25-Wildtyp. B, HSP25- Δ C18-Mutante. Die Proteinkonzentration betrug bei beiden Präparaten 0,1 mg/ml. Die Meßbalken weisen eine Länge von 50 nm auf. Vergrößerung 270.000 x.

3.2.2.2 Statistische Analyse der Partikelgrößen

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen rekombinanten HSP25-Spezies wurden mit Hilfe des Programmes *analySIS* (Soft Imaging System GmbH, Münster) hinsichtlich der Größenverteilung der Partikel analysiert (Zur Methodik siehe Kapitel 2.7.2.3). Um die Proben miteinander vergleichen zu können, wurde bei der Herstellung aller Präparate die gleiche Proteinkonzentration (0,1 mg/ml) eingesetzt und die gleiche Auftragszeit gewählt. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse der Partikelanalyse in den Präparaten des Wildtyps und der Mutanten des HSP25 des Menschen ist in Tab. 3.2 zusammengefaßt. Ausgehend vom mittleren Durchmesser der Wildtyp HSP25-Komplexe wurde das Volumen einer entsprechenden Kugel berechnet. Unter Verwendung des partiellen spezifischen Volumens (0,7326 ml/g für HSP25) und basierend auf der Annahme, daß eine hexagonale Packung der Monomere mit einer Packungsdichte von 74% vorliegt, konnte dann das Molekulargewicht der zur Kugel approximierten Komplexe und damit die Anzahl der HSP25-Monomere in den Komplexen abgeschätzt werden. Die hexagonale Anordnung der Monomere entstammt dem Strukturmodell einer früheren Untersuchung von rekombinanten HSP25-Komplexen von Behlke *et al.* (1991), nach der die Hauptfraktion der Wildtyp-Komplexe aus 32 kugelförmigen Monomeren besteht. Unter Annahme dieser Anordnung korrespondieren die fünf Haupt-Größenklassen der Wildtyp-Komplexe (Klassen im Größenbereich von 100 bis 200 nm²) bei einem mittlerem Durchmesser von ca. 14 bis 18 nm mit einer Anzahl von etwa 24 bis 54 HSP25-Molekülen. Im Mittel sind das etwa 38 Monomere pro HSP25-Komplex.

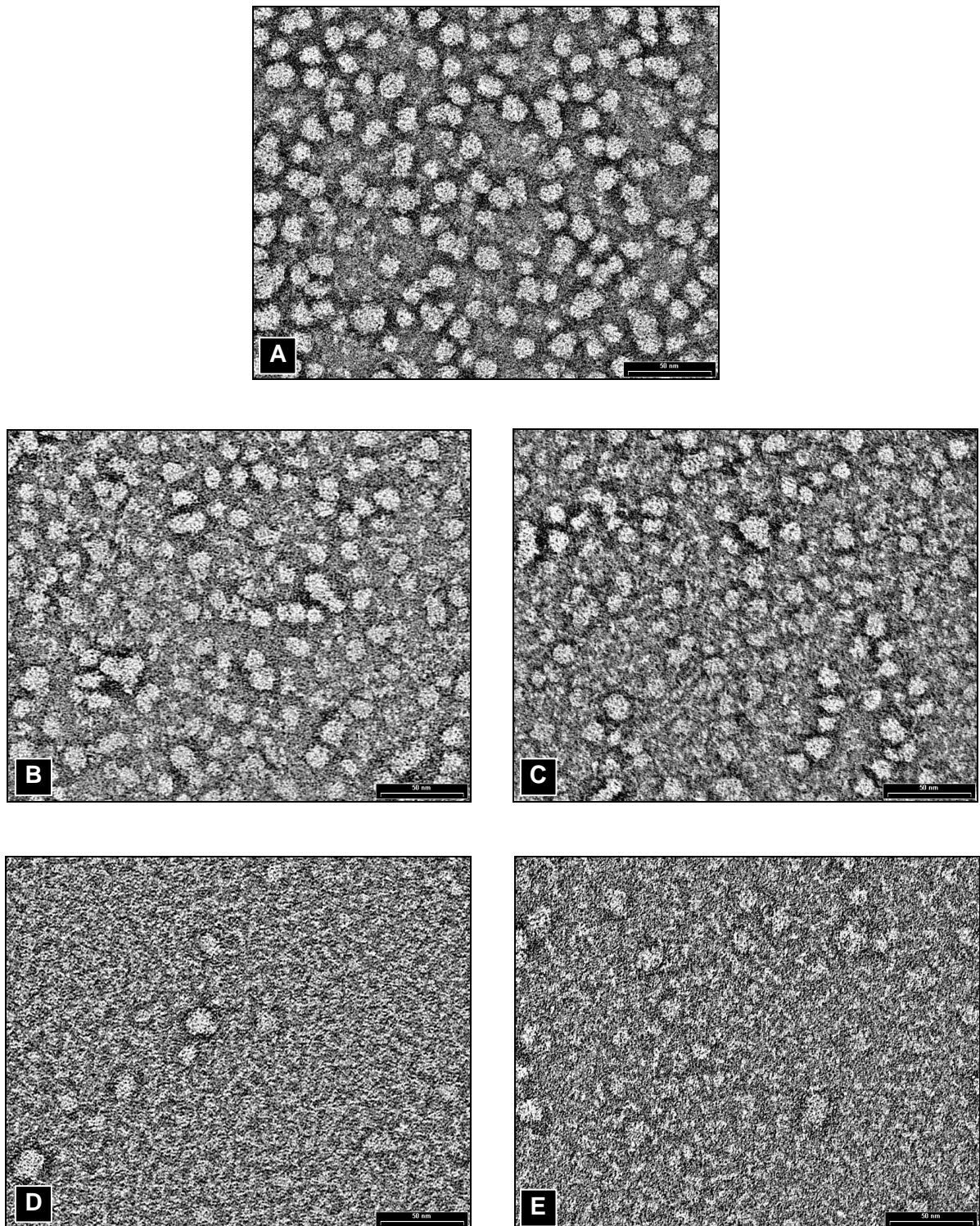


Abb. 3.8: Elektronenmikroskopische Darstellung von rekombinantem menschlichem HSP25

A, HSP25-Wildtyp. B, HSP25-S15D. C, HSP25-S78,82D. D, HSP25-S15,78,82D. E, phosphoryliertes wt-HSP25. Die Proteinkonzentration betrug bei allen Präparaten 0,1 mg/ml. Die Meßbalken weisen eine Länge von 50 nm auf. Vergrößerung 270.000 x.

3.3 Wechselwirkung von kHSPs mit Actin

3.3.1 Hemmung der Actinpolymerisation durch kHSPs und HSP25-Mutanten

Zur Messung der Actinpolymerisation wurde Pyrenyl-markiertes G-Actin verwendet, das durch die Zugabe von Actin-Keimen und Salzen zur Polymerisation gebracht wird. Die fortschreitende Polymerisation des Actins wurde in einem Fluoreszenzphotometer als Anstieg in der Fluoreszenzintensität registriert (siehe Kapitel 2.9). Unter den gewählten Bedingungen ist der Start der Polymerisation von der Gegenwart von Actin-Keimen abhängig (Pollard, 1983) (Abb. 3.9 A, Kurve 1). Der Verzicht auf die Keime resultiert in einer verlängerten Verzögerungsphase der Polymerisation (Abb. 3.9 A, Kurve 2).

In Abb. 3.9 B ist der Einfluß von nativem HSP25 auf die Actinpolymerisation dargestellt. Die Hemmung der Actinpolymerisation durch dieses Präparat ist deutlich zu erkennen (Kurve 2). Das isolierte HSP25 liegt nach den schon dargelegten elektronenmikroskopischen und hydrodynamischen Analysen (vgl. Kapitel 3.2.1) zum Teil als Monomer vor, und diese Fraktion ist wahrscheinlich für die Hemmung der Actinpolymerisation verantwortlich. Die abgeschätzte Aktivität dieser HSP25-Fraktion liegt bei ca. der Hälfte des von Benndorf *et al.* (1994) ermittelten Wertes, was mit der fehlenden Auftrennung dieser Probe in die einzelnen HSP25-Spezies erklärt werden kann. Die für diese Versuche notwendigen Mengen an Monomeren wurden hier nicht noch einmal isoliert.

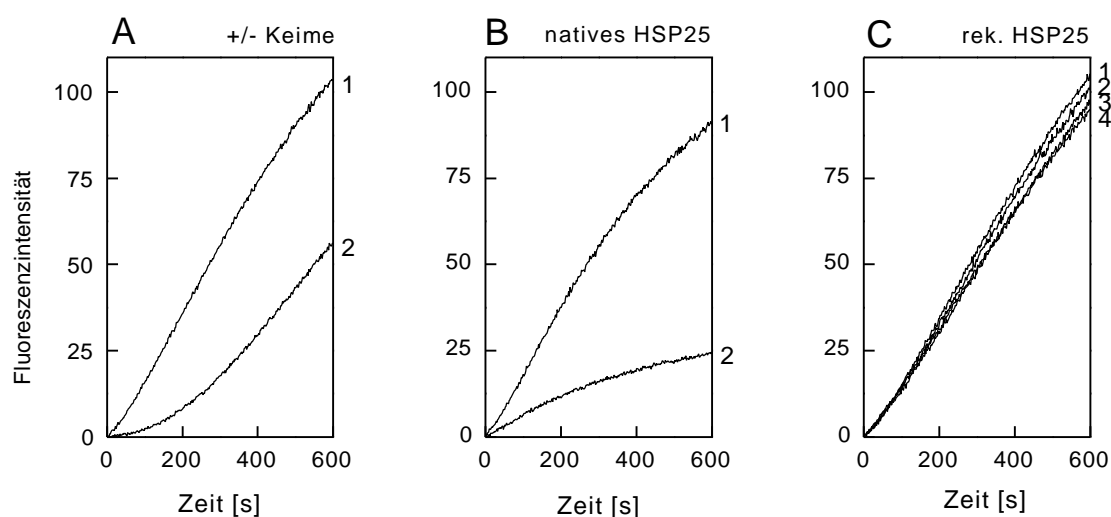


Abb. 3.9: Hemmung der Actinpolymerisation durch kHSPs und HSP25-Mutanten

A, Actinpolymerisation (50 µg/ml G-Actin = 1,16 µM) ohne (Kurve 1) oder mit 4,3 µg/ml (= 0,1 µM) Actin-Keimen (Kurve 2). B, Actinpolymerisation (50 µg/ml G-Actin) unbeeinflusst (Kurve 1) oder in Anwesenheit eines zweifachen molaren Überschusses an nativem HSP25 (Kurve 2). C, Actinpolymerisation (50 µg/ml G-Actin) unbeeinflusst (Kurve 1) oder in Anwesenheit eines 20-fachen molaren Überschusses an humanem HSP25 (Kurve 3), murinem HSP25-ΔC18 (Kurve 2, nur 10-facher Überschuss) bzw. humanem HSP25-S15,78,82D (Kurve 4).

Parallel zum nativen HSP25 wurden α B-Crystallin (kommerzielles Produkt von Sigma, Deisenhofen), rekombinantes murines und humanes HSP25 sowie die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Mutanten im Actinpolymerisations-Assay verwendet. Bei diesen Versuchen blieben sowohl α B-Crystallin als auch alle rekombinanten Proteine ohne Wirkung. Stellvertretend ist in Abb. 3.9 C die Actinpolymerisation in Anwesenheit eines 20-fachen molaren Überschusses an rekombinantem Wildtyp-HSP25 des Menschen und der Dreifach-Mutante (HSP25-S15,78,82D), bzw. eines 10-fachen molaren Überschusses an der Mutante mit dem verkürzten C-Terminus (HSP25- Δ C18) dargestellt.

Da sowohl das rekombinante HSP25 als auch α B-Crystallin hauptsächlich als hochmolekulare Komplexe vorliegen, deuten die Ergebnisse darauf hin, daß diese Proteine aufgrund ihres Assoziationszustandes nicht in der Lage sind, die Actinpolymerisation zu hemmen. Interessanterweise bildet die Mutante mit den drei Aminosäureaustauschen keine hochmolekularen Komplexe mehr (vgl. Kapitel 3.2.2), so daß hier die Proteine als Mono- bis Oligomere mit simulierter Phosphorylierung vorliegen. Da auch diese Mutante die Actinpolymerisation nicht hemmt, wird die Hypothese bestätigt, daß für die Funktion als Inhibitor der Actinpolymerisation zumindest *in vitro* nur die monomeren nichtphosphorylierten HSP25-Moleküle verantwortlich sind.

3.3.2 Hemmung der Actinpolymerisation durch Peptide von kHSPs

Um zu analysieren, welche Teile des HSP25-Moleküles hauptverantwortlich für die inhibitorische Wirkung bei der Actinpolymerisation sind, wurde eine Peptid-Bibliothek synthetisiert, die die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins in Form von sich überlappenden Peptidsequenzen umfaßt. Als Kriterium für die Synthese wurde eine Peptidlänge von 15 Aminosäuren und eine Überlappung von ca. fünf Aminosäuren zugrundegelegt. In Tab. 3.3 sind die entsprechenden Peptidsequenzen aufgelistet.

Peptid	Rest	Sequenz	Rest
1	1	MTERRV PFSLLR	12
2	7	PFSLLR SP SWEP	18
3	14	PSWEP FRD WYPAHSR	28
4	24	PAHSRL FDQ AFGVPR	38
5	34	FGVPR LP DEWSQWFS	48
6	43	WSQWF SAAG WPGYVR	57
7	53	PGYVR PLPA TAEGP	67
8	63	TAEGP AAVT LAAPAF	77
9	73	AAPAF SRAL NRQLSS	87
10	83	RQLSS GVSE IRQTA	96
11	92	IRQT ADRW RVSLDVN	106
12	102	SLDV NHFA PEELTVK	116
13	112	ELTV KTEG VVEITG	126
14	121	VVEIT GKHEE RQDEH	135
15	131	RQDE HGYIS RCFTRK	145
16	140	RCFTR KYTL PPGVDP	154
17	150	PGVD PTLV SSSLSPE	164
18	160	SLSP EGTL TVEAPLP	174
19	169	VEAPL PKAV TQSAEI	183
20	177	VTQSAE ITIP VTFEA	191
21	186	PVTFEA RAQI GGPEA	200

Tab. 3.3: Peptid-Bibliothek der HSP25-Sequenz

Peptid 1 repräsentiert den N-Terminus und Peptid 22 den C-Terminus des Proteins. Die Peptide haben überlappende Enden von 4-7 Aminosäuren und wurden bis auf die Peptide 1, 2 und 10 als 15mer synthetisiert. Die nicht mit Nachbarpeptiden überlappenden Regionen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

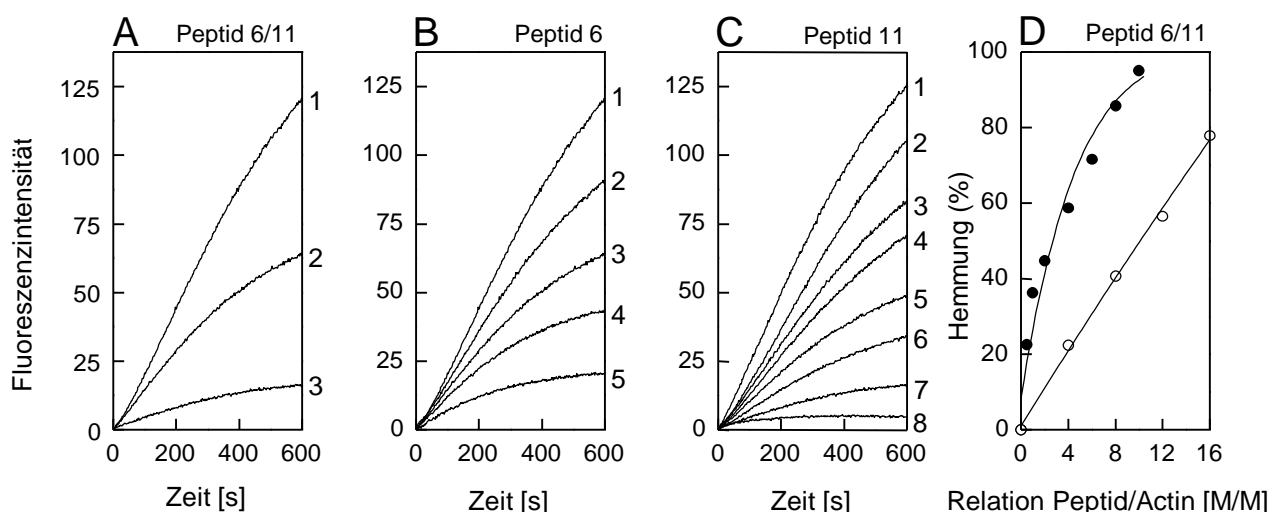


Abb. 3.10: Einfluß von HSP25 Peptid 6 und 11 auf die Actinpolymerisation

A, Actinpolymerisation ($2\mu\text{M}$ G-Actin) in Abwesenheit (Kurve 1) oder Anwesenheit von $16\mu\text{M}$ Peptid 11 (Kurve 3) oder $16\mu\text{M}$ Peptid 6 (Kurve 2). B, Actinpolymerisation in Anwesenheit von 0-, 4-, 8-, 12- und 16-fachem molaren Überschuß von Peptid 6 zu G-Actin ($2\mu\text{M}$), Actinpolymerisation in Anwesenheit von 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 und 10-fachem molaren Überschuß von Peptid 11 zu G-Actin ($2\mu\text{M}$). D, prozentuale Hemmung der Actinpolymerisation bei verschiedenen molaren Verhältnissen von Peptid 6 (○) und Peptid 11 (●) zu G-Actin. Die Daten ergeben sich aus dem Anstieg der in Teil B und C dargestellten Kurven.

Die Peptide wurden im Actinpolymerisations-Assay zunächst bei einem 20-fachen molaren Überschuß zu G-Actin getestet. Von diesen Peptiden wiesen Peptid 6 (Trp43-Arg57) und Peptid 11 (Ile92-Asn106) einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf. Alle anderen Peptide hatten unter diesen Bedingungen keinen signifikanten Einfluß. Peptid 11 ist dabei wesentlich effizienter als Peptid 6 (Abb. 3.10 A).

Die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung dieser beiden Peptide ist in Abb. 3.10 B und C wiedergegeben. Dabei wurde Peptid 6 (Abb. 3.10 B) mit einem 4-, 8-, 12- und 16-fachen molaren Überschuß eingesetzt und Peptid 11 (Abb. 3.10 C) bei molaren Verhältnissen von 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, und 10 von Peptid zu G-Actin getestet. Die Abschätzung der Aktivität der Peptide als prozentuale Hemmung der Actinpolymerisation wurde aus der Steigung dieser Kurven während der ersten 5 min ermittelt und ist in Abb. 3.10 D dargestellt. Aus diesen Daten geht hervor, daß eine 50%ige Hemmung im Falle von Peptid 6 bei einem molaren Verhältnis von 1:10 und im Falle von Peptid 11 bei einem Verhältnis von 1:2,5 erreicht wird.

Als zweite, unabhängige Methode zur Kontrolle der Actinpolymerisation wurde die Elektronenmikroskopie genutzt. In diesem Fall wurden die Bedingungen insoweit modifiziert, als die Actin-Keime weggelassen wurden, um sicher zu sein, daß alle beobachteten Actinfilamente neu gebildet waren. Außerdem wurden die Versuchsansätze für 15 min inkubiert, bevor sie für die elektronenoptische Auswertung verarbeitet wurden, um der verlängerten Verzögerungsphase bei der Abwesenheit von Polymerisations-Keimen Rechnung zu tragen (vgl. Abb. 3.10 A). In Abb. 3.11 ist der Einfluß von Peptid 11 auf die Actinpolymerisation zu erkennen.

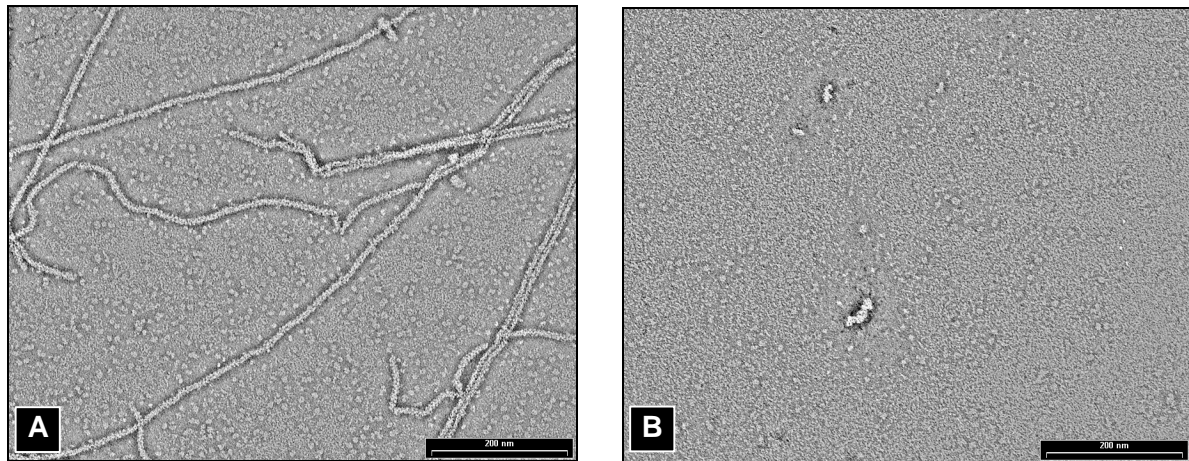


Abb. 3.11: Darstellung des Einflusses von HSP25 Peptid 11 auf die Actinpolymerisation mittels Elektronenmikroskopie

A, Actinpolymerisation (1 μM) in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit von 10 μM Peptid 11 (B). Die Maßbalken weisen eine Länge von 200 nm auf. Vergrößerung, $\times 90\,000$.

Während es bei der Kontrolle (1 μM G-Actin) zur Ausbildung von langen Actinfilamenten kommt (Abb. 3.11 A), werden in Anwesenheit von 10 μM Peptid 11 keine Filamente mehr gebildet (Abb. 3.11 B). Die Anwesenheit derselben Menge Peptid 6 führt zu einer reduzierten Anzahl an Filamenten (nicht gezeigt). Damit bestätigen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Resultate der Fluoreszenzspektroskopie.

Um zu analysieren, welche Aminosäuren des effektivsten Peptids 11 hauptverantwortlich für die Hemmung der Actinpolymerisation sind, wurden N-terminal und C-terminal verkürzte Varianten dieses Peptids hergestellt. Der Einfachheit halber wurden für die Benennung dieser Peptide Abkürzungen verwendet, wie sie in Tab. 3.4 aufgelistet sind. Im Experiment zeigten alle verkürzten Peptide eine schwächere, z.T. sogar deutlich schwächere Aktivität bei der Hemmung der Actinpolymerisation im Vergleich zum Original-15mer. Aus diesem Grund wurden sie bei höheren molaren Verhältnissen von Peptid zu Actin getestet. Bei einem 40-fachen Überschuß an verkürztem Peptid ergab sich das in Abb. 3.12 A wiedergegebene Bild mit folgenden Reihenfolge in der Effektivität: Peptid 11 Δ N1 (Kurve 8) > Peptid 11 Δ N6 (Kurve 7) >> Peptid 11 Δ C4 (Kurve 6) > Peptid 11 Δ N2 (Kurve 5) = Peptid 11 Δ N9 (Kurve 4) = Peptid 11 Δ C6 (Kurve 3) > Peptid 11 Δ N3 (Kurve 2). Die Peptide 11 Δ C8 und 11 Δ N4C3 waren in diesem Assay inaktiv (nicht gezeigt). In Tab. 3.4 sind die relativen Aktivitäten dieser Peptide im Vergleich zu Peptid 11 als Zahlenwerte dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß es keine einfache Korrelation zwischen der Länge der Peptide und der Beibehaltung der Funktion von Peptid 11 gibt. Während bei einer Kürzung des N-Terminus um die beiden Aminosäuren IR (Peptid 11 Δ N2) ein drastischer Abfall in der Aktivität zu beobachten ist, hat die Kürzung des C-Terminus um die 4 Aminosäuren LDVN (Peptid 11 Δ C4) einen deutlich schwächeren Effekt. Die Verkürzung des C-Terminus um die 6 Aminosäuren VSLDVN (Peptid 11 Δ C6) reduziert die inhibitorische Aktivität des Peptids weiter, wohingegen eine Verkürzung des N-Terminus um

die 6 Aminosäuren IRQTAD (Peptid 11ΔN6) im Vergleich zu den um IR und IRQ verkürzten Peptiden eine erneute Steigerung der hemmenden Aktivität bewirkt. Die Wiederherstellung dieser Funktion trotz der Verkürzung von Peptid 11 über Peptid 11ΔN1, 11ΔN2 und 11ΔN3 zu Peptid 11ΔN6 deutet auf eine besondere Rolle des Sequenzelementes TAD hin. Man könnte diese drei Aminosäuren für die Verbindungssequenz zwischen den beiden Regionen des Peptids halten, die die funktionelle Einheit für die Interaktion mit Actin bilden. Im Falle des Peptids 11ΔN4C3 ist die Aktivität völlig verlorengegangen. Dieses Peptid umfaßt die zentralen 8 Aminosäuren von Peptid 11 und bestätigt zusammen mit den Ergebnissen von Peptid 11ΔN2, 11ΔN3 und 11ΔC4, daß die N-terminalen Aminosäuren IRQ und die C-terminalen Aminosäuren DVN die größte Bedeutung bei der Interaktion von Peptid 11 mit Actin besitzen. Daß nicht nur die Kürze des Peptids 11ΔN4C3 (ADRWRVSL) für die mangelnde Fähigkeit, mit Actin zu interagieren verantwortlich ist, kann aus der Tatsache geschlossen werden, daß das nur 6 Aminosäuren umfassende Peptid 11ΔN9 (VSLDVN) schon einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Actinpolymerisation hat. Da die Sequenzmotive IRQ oder DVN auch in den benachbarten, aber inaktiven Peptiden 10 und 12 enthalten sind, folgt außerdem, daß sie allein nicht ausreichend sind für die hemmende Wirkung auf die Actinpolymerisation. Ein Vergleich der inhibitorischen Wirkung der Peptide 11ΔN3, 11ΔC4 und 11ΔN4C3 deutet schließlich auf eine gegenseitige Verstärkung bei der Wirkung der Sequenzen IRQ und DVN hin.

Tab. 3.4: Vergleich der vom Maus HSP25 Peptid 11 abgeleiteten Sequenzen

Die Peptide wurden entsprechend der HSP25-Sequenz verschiedener Spezies (Maus, Mensch und Huhn) und der Maus αB-Crystallin-Sequenz synthetisiert. N- bzw. C-terminale Verkürzungen oder Verlängerungen, ausgehend vom Peptid 11 der Maus, spiegeln sich in der Bezeichnung der Peptide wider. Die Nummern geben die Position der N-terminalen (links) und der C-terminalen (rechts) Aminosäuren der Peptide im Protein an. Die Effektivität der Peptide im Actinpolymerisationsexperiment ist durch relative Werte im Vergleich zum Peptid 11 angegeben. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die phosphorylierte Variante des Peptids (P). Die jeweils phosphorylierten Serinreste sind in der Sequenz durch Unterstreichen und Fettdruck markiert.

Peptid	Sequenz			relative Aktivität	Spezies
11	92	IRQTADRWRVSLDVN	106	100	Maus
11Hu	88	IRHTADRWRVSLDVN	102	0	Mensch
11Ch	86	IRQSADSWKVTLVDN	100	10	Huhn
11αB	68	MRLEKDRFSVNLDVK	82	0	Maus
11rm	–	TWLQRDANVRDISRV	–	0	–
11ΔC4	92	IRQTADRWRVS	102	10	Maus
11ΔC6	92	IRQTADRWR	100	5	Maus
11ΔC8	92	IRQTADR	98	0	Maus
11ΔN1	93	RQTADRWRVSLDVN	106	25	Maus
11ΔN2	94	QTADRWRVSLDVN	106	5	Maus
11ΔN3	95	TADRWRVSLDVN	106	2	Maus/Mensch
11ΔN6	98	RWRVSLDVN	106	12	Maus/Mensch
11ΔN9	101	VSLDVN	106	5	Maus/Mensch
11ΔN4C3	96	ADRWRVSL	103	0	Maus/Mensch
11+N16 (P)	76	AFSRALNRQLSSGVSEIRQTADRWRVSLDVN	106	50 (25)	Maus
11Hu+N16 (P)	72	AYSRALSRQLSSGVSEIRHTADRWRVSLDVN	102	12 (0)	Mensch
11αB+N15 (P)	53	SFLRAPSW-IDTGLSEMRLEKDRFSVNLDVK	82	50 (25)	Maus

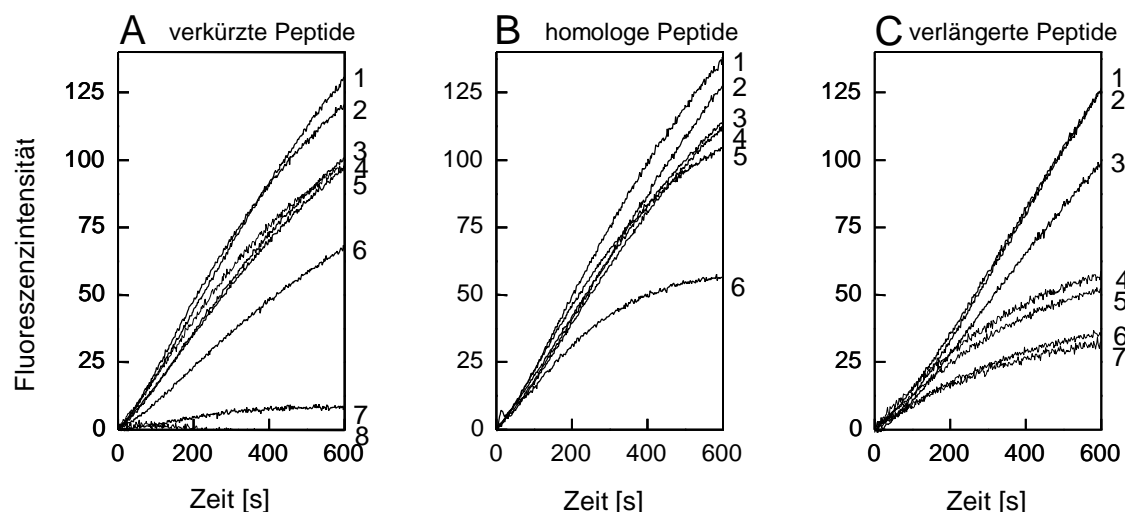


Abb. 3.12: Einfluß verschiedener Peptid 11-Abkömmlinge auf die Actinpolymerisation

A, Actinpolymerisation (2 μ M G-Actin) ohne Peptide (Kurve 1) oder in Gegenwart von 80 μ M der verkürzten Peptide 11 Δ N3 (Kurve 2), 11 Δ C6 (Kurve 3), 11 Δ N2 (Kurve 4), 11 Δ N9 (Kurve 5), 11 Δ C4 (Kurve 6), 11 Δ N6 (Kurve 7) und 11 Δ N1 (Kurve 8). B, Actinpolymerisation (2 μ M G-Actin) ohne Peptide (Kurve 2) oder in Gegenwart von 40 μ M der zu Peptid 11 homologen Peptide des α B-Crystallins (11 α B, Kurve 1), des menschlichen HSP25 (11Hu, Kurve 3), des HSP25 des Huhns (11Ch, Kurve 5) und des Zufallspeptids (11rm, Kurve 4) sowie in Gegenwart von 80 μ M des Huhn-Peptids (11Ch, Kurve 6). C, Actinpolymerisation (2 μ M G-Actin) ohne Peptide (Kurve 1) oder in Gegenwart von 20 μ M der verlängerten Peptide 11Hu+N16P (Kurve 2), 11Hu+N16 (Kurve 3), 11 α B+N15P (Kurve 4), 11+N16P (Kurve 5), 11+N16 (Kurve 6) und 11 α B+N15 (Kurve 7). Die Kurven sind Repräsentanten aus 3 bis 5 unabhängigen Versuchen.

Aufgrund der konservierten Struktur und Funktion der kleinen Hitzeschockproteine und des ubiquitären Vorkommens von Actin in eukaryotischen Zellen konnte man vermuten, daß die homologen Regionen des Maus-HSP25-Peptids 11 aus anderen Spezies ebenfalls die Polymerisation von Actin inhibieren. Aus diesem Grund wurden die zum Peptid 11 homologen Sequenzen des humanen (11Hu) und des Huhn-HSP25 (11Ch) sowie die des murinen α B-Crystallin (11 α B) synthetisiert. Die Sequenzen wurden einem Vergleich entnommen, der für die gesamte Aminosäuresequenz dieser Proteine durchgeführt wurde, wie sie in Abb. 3.13 gezeigt sind. Aus der Gegenüberstellung in Tab. 3.4 geht hervor, daß die menschliche Sequenz von Peptid 11 an einer Position (Glu3 \rightarrow His), die Huhn-Sequenz an vier Positionen (Thr4 \rightarrow Ser; Arg7 \rightarrow Ser; Arg9 \rightarrow Lys und Ser11 \rightarrow Thr) und die α B-Crystallin-Sequenz an acht Positionen (Ile1 \rightarrow Met, Gln3 \rightarrow Leu, Thr4 \rightarrow Glu, Ala5 \rightarrow Lys, Trp8 \rightarrow Phe, Arg9 \rightarrow Ser, Ser11 \rightarrow Asn und Asn15 \rightarrow Lys) von der Maus-Sequenz abweicht. Außerdem wurde als Kontrolle eine Zufallssequenz mit den Aminosäuren des Peptids 11 konstruiert (11rm). Erstaunlicherweise hatten bei einem 20-fachen molaren Überschuß sowohl das von der α B-Crystallin-Sequenz abgeleitete als auch das menschliche Peptid 11 keinen Einfluß auf die Actinpolymerisation *in vitro* (Abb. 3.12 B, Kurven 1 und 3). Dies traf auch für das Zufallspeptid zu (Abb. 3.12 B, Kurve 4). Das Huhn-HSP25-Peptid 11 (11Ch) hatte einen schwachen Effekt (Abb. 3.12 B, Kurve 5), der sich allerdings bei

Die getesteten Modifikationen von Peptid 11 zeigen, daß es keinen einfachen Zusammenhang zwischen der Aminosäuresequenz und der Beeinflussung der Funktion gibt. Der Vergleich der Sequenzen von murinem und menschlichem HSP25 deutet allerdings auf eine essentielle Rolle des Glutamins an Position 3 des Peptids 11 hin (Position 94 in HSP25), da das inaktive menschliche Peptid 11 nur an dieser Stelle von der murinen Sequenz abweicht. Eine regulatorische Rolle durch Methylierung scheint dem Histidin des menschlichen Proteins an dieser Stelle nicht zuzukommen, da die methylierten Varianten des humanen Peptids 11 sich im Actinpolymerisationsexperiment nicht anders verhielten als das nicht methylierte Peptid. Aus den Daten geht weiterhin hervor, daß ein aktives Peptid mindestens neun Aminosäuren lang sein sollte, da alle kürzeren Peptide und ein 9mer nur noch sehr geringe Aktivitäten als Inhibitoren der Actinpolymerisation aufwiesen. Zusammen mit den Ergebnissen mit dem Zufallspeptid deutet dies darauf hin, daß nicht allein die Aminosäurezusammensetzung, sondern die Sequenz in Kombination mit der Sekundärstruktur zu dem inhibierenden Effekt der Peptide führt.

Wie schon in der Einleitung besprochen, ist eine auffällige Eigenschaft von HSP25 die rasche Phosphorylierbarkeit. Es ist bekannt, daß die Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Actinpolymerisation-hemmenden Eigenschaft von HSP25 spielt (Benndorf *et al.*, 1994). Aus diesem Grund wurden die Peptide aus der murinen bzw. humanen Sequenz, die das Peptid 11 und die N-terminal angrenzende Phosphorylierungsstelle am Serin 86 bzw. an den Serinen 78 und 82 umfaßten und ein dazu homologes Peptid aus der Sequenz des α B-Crystallins der Maus synthetisiert und getestet. Die resultierenden Peptide waren 31 bzw. 30 Aminosäuren lang und beinhalteten die Aminosäuren 76 bis 106 (Maus HSP25: 11+N16) bzw. 72 bis 102 (Mensch HSP25: 11Hu+N16) oder 53 bis 82 im Falle des Maus α B-Crystallins (11 α B+N15). Von diesen Peptiden wurde jeweils die phosphorylierte und die unphosphorylierte Variante hergestellt, um zu testen, ob diese Modifikation, ähnlich wie beim gesamten Protein, die Polymerisations-hemmende Wirkung beeinflussen kann. Aus Abb. 3.12 C geht hervor, daß die unphosphorylierten Peptide aus der Sequenz des murinen HSP25 (Peptid 11+N16, Kurve 6) und des α B-Crystallins (11 α B+N15, Kurve 7) die Actinpolymerisation bei einem 10-fachen molaren Überschuß etwa halb so effektiv hemmen wie das Peptid 11 (vgl. Abb. 3.10 C). Die dazugehörigen phosphorylierten Varianten (11+N16P, Kurve 5 und 11 α B+N15P, Kurve 4) zeigen ebenfalls noch einen deutlichen Hemmeffekt, der jedoch in beiden Fällen signifikant schwächer ausfällt als bei den entsprechenden unphosphorylierten Peptiden. Im Vergleich dazu hat das unphosphorylierte humane HSP25-Peptid (11Hu+N16) einen wesentlich schwächeren Effekt (Abb. 3.12 C, Kurve 3) und die phosphorylierte Variante dieses Peptids (Hu11+N16P) war sogar inaktiv (Abb. 3.12 B, Kurve 2). Der Unterschied zwischen phosphorylierter und nichtphosphorylierter Variante des humanen Peptids wurde bei einem 20-fachen Überschuß zum Actin wesentlich deutlicher. Während der Effekt des unphosphorylierten Peptids deutlich ansteigt, bleibt das phosphorylierte Peptid auch unter diesen Bedingungen inaktiv (nicht gezeigt). Die relativen Aktivitäten aller getesteten Peptide im Vergleich zu Peptid 11 können aus Tab. 3.4 entnommen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die regulatorische Rolle der Phosphorylierung in Bezug auf die Funktion von HSP25 als Inhibitor der Actinpolymerisation. Darüber hinaus belegen sie die besondere Bedeutung des zweiten (Maus) bzw. dritten (Mensch)

Phosphorylierungsortes die in enger räumlicher Nähe zu der Sequenz mit der effektivsten Hemmeigenschaft liegen.

3.3.3 Hydrodynamische Parameter von Actin und HSP25-Peptiden

Die Bestimmung der molekularen Masse von G-Actin wurde aus der radialen Konzentrationsverteilung unter Sedimentations-Gleichgewichts-Bedingungen bestimmt und betrug 41.300 ± 700 Dalton. Dabei lag das G-Actin bei einem Sedimentationskoeffizienten von $3,0 \pm 0,1$ S als homogene Fraktion ohne Oligomere vor. Peptid 11 liegt in Lösung ebenfalls als Monomer vor, was sich aus der molekularen Masse von 1825 ± 166 Dalton ergibt. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit dem aus der Aminosäure-Zusammensetzung berechneten theoretischen Molekulargewicht von 1830 Dalton und zeigt, daß das Peptid nicht zur Selbstassoziation neigt. Die hydrodynamischen Parameter einiger weiterer untersuchter Peptide sind in Tab. 3.5 aufgelistet. In allen Fällen liegen die Peptide offensichtlich als Monomere vor. Die Reibungsverhältnisse f/f_0 deuten auf eine leichte bis deutliche Abweichung von der Kugelform bei der Konformation der Peptide in Lösung hin, wie dies für Peptide dieser Größenordnung zu erwarten ist.

Tab. 3.5: Hydrodynamische Parameter einiger HSP25-Peptide

M_{th} = theoretisches Molekulargewicht, M_{ex} = experimentell bestimmtes Molekulargewicht, s = Sedimentationskoeffizient, D = Diffusionskoeffizient, \bar{V} = partielles spezifisches Volumen, f/f_0 = Reibungsverhältnis, V = Volumen

Peptid	M_{th}	M_{ex}	s (S)	D ($10^7 \text{ cm}^2/\text{s}$)	\bar{V} (ml/g)	f/f_0	V (nm^3)
11	1829	1825 ± 166	$0,455 \pm 0,017$	$22,15 \pm 1,15$	0,725	$1,19 \pm 0,02$	2,203
11 Δ C6	1201	1184 ± 42	$0,297 \pm 0,003$	$21,76 \pm 0,54$	0,718	$1,40 \pm 0,01$	1,433
11 Δ C4	1388	1373 ± 40	$0,310 \pm 0,002$	$19,88 \pm 0,45$	0,723	$1,46 \pm 0,02$	1,667
11 Δ N4C3	1002	996 ± 47	$0,290 \pm 0,006$	$26,96 \pm 0,61$	0,729	$1,20 \pm 0,01$	1,214
11+N16	3533	3506 ± 262	$0,517 \pm 0,015$	$13,07 \pm 0,60$	0,725	$1,62 \pm 0,06$	4,253
11+N16P	3612	3597 ± 272	$0,526 \pm 0,019$	$12,97 \pm 0,53$	0,725	$1,62 \pm 0,06$	4,348

Um die Stärke der Wechselwirkung zwischen G-Actin und Peptid 11 zu untersuchen, wurden verschiedene Mischungen von $3,9 \mu\text{M}$ Protein und äquimolaren Mengen an Peptid 11 bis zu einem 7-fachen Überschuß an Peptid zentrifugiert. Die Konzentrationsverteilungs-Kurven unter Sedimentations-Gleichgewichts-Bedingungen wurden dann im Hinblick auf die partiellen Konzentrationen der Reaktanten analysiert (Abb. 3.14). Dabei wurde die Bildung eines 1:1 Komplexes zwischen G-Actin und dem Peptid angenommen. Aus diesen Daten wurde eine

Assoziationskonstante von $3,7 \pm 0,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ermittelt. Zur Kontrolle wurde das im Polymerisationsexperiment inaktive Peptid 3 unter denselben Bedingungen untersucht. In diesem Fall konnte keine signifikante Assoziationskonstante ermittelt werden (nicht gezeigt).

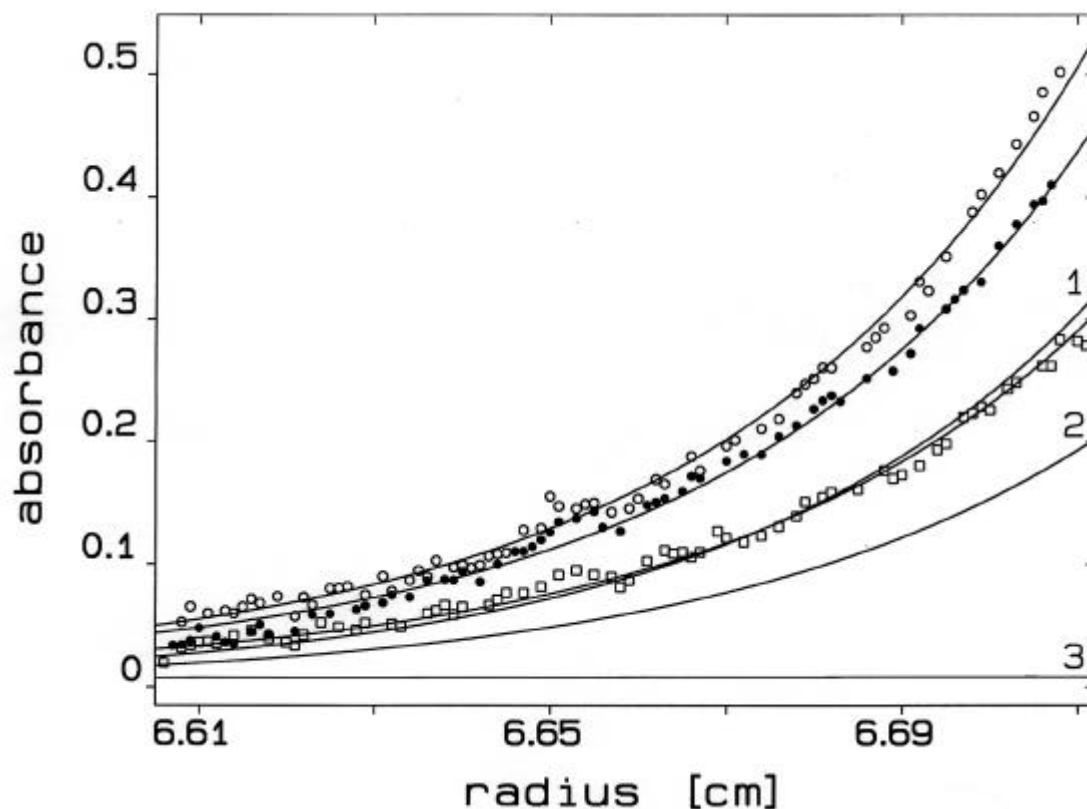


Abb. 3.14: Konzentrationsverteilungskurven von Actin und Peptid 11

Radiale Konzentrationsverteilungen von Actin und Peptid 11 bei einem 5-fachen molaren Überschuß an Peptid unter Sedimentations-Gleichgewichts-Bedingungen, aufgezeichnet bei 280 nm (○), 285 nm (●) und 290 nm (□). Die partiellen Konzentrationen des Actin/Peptid-Komplexes (Kurve 1), der freien Actins (Kurve 2) und des freien Peptids (Kurve 3) für die bei 280 nm aufgezeichnete Konzentrationsverteilung wurden wie in Kapitel 2.8 beschrieben ermittelt.

3.3.4 Peptid-Epitop-Scanning von HSP25 und Actin

Zellulose-gebundene Peptid-Bibliotheken wurden von der HSP25- und der Actin-Sequenz angefertigt. Hinweise für einer Interaktion zwischen HSP25 und Actin waren mit dieser Methode nur bei der Inkubation von HSP25 mit der Actin-Peptidmembran, nicht aber bei der Inkubation von Actin mit der HSP25-Peptidmembran zu erkennen. Die Wechselwirkungen konnten erst bei der direkten Detektion der gebundenen Proteine auf der Peptid-Membran nachgewiesen werden, vorausgegangene Elektrotransferversuchen zum indirekten Nachweis der gebundenen Proteine auf einer Western-Blot-Membran blieben ohne Erfolg. In Abb. 3.15 ist das Ergebnis des direkten Nachweises von HSP25 auf der Actin-Membran dargestellt. Es konnten insgesamt 11 Actinpeptide detektiert werden, an denen HSP25 gebunden war. Die Sequenzen dieser Peptide sind in Tab. 3.6 zusammengestellt. Viermal wurden einzelne Peptide und zweimal mehrere nebeneinander liegende Peptide, also überlappende Sequenzen detektiert. Die Markierung war am intensivsten bei den Peptiden 79 und 99, also in der Mitte der von Peptid 78-80 und 97-100 gebildeten Sequenzbereiche. Die Konsensusmotive dieser Sequenzbereiche umfassen die Aminosäuren 158-168 und 198-204 im Actinmolekül.

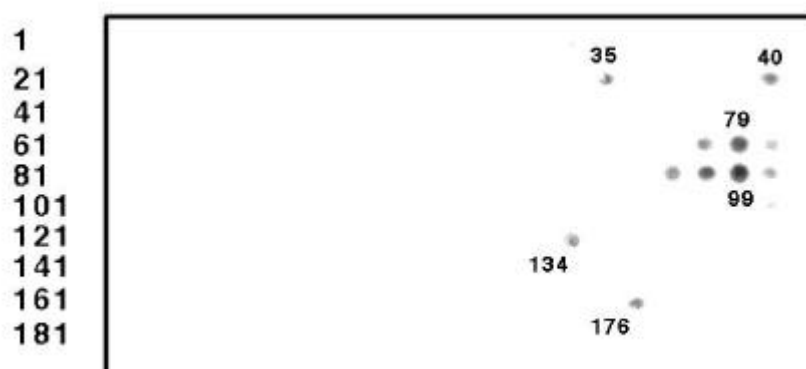


Abb. 3.15: Nachweis von HSP25 nach der Inkubation auf der Actin-Membran

Die Nummern entsprechen den Peptiden der Actin-Bibliothek (siehe Tab. 7.3 im Anhang).

Nr.	Sequenz	Aminosäure
35	YPI EHGI I TNWDD	68- 80
40	WDDMEKI WHITFY	78- 90
78	SGDGVIHNVPI VE	154- 166
79	DGVIHNVPI YEGY	156- 168
80	VIHNVPI YEGYAL	158- 170
97	LTERGYSFVTTAE	192- 204
98	ERGYSFVTTARE	194- 206
99	GYSFVTTAREI V	196- 208
100	SEVTTAREI VRD	198- 210
134	I GMESAGI HETTY	266- 278
176	TFQQMM TKQEYD	350- 362

Tab. 3.6: Sequenzen der mit HSP25 wechselwirkenden Actin-Peptide

Aufgelistet sind die Sequenzen der detektierten Peptide wie in Abb. 3.15 dargestellt. Die Nummern entsprechen den Peptiden der Actin-Bibliothek (siehe Tab. 7.3 im Anhang). Die Konsensusmotive der beiden detektierten Sequenzbereiche sind durch Einrahmung hervorgehoben.

3.4 HSP25- und HSP70-Gehalt in Organen normotoner und hypertoner Ratten

3.4.1 Spontan hypertensive Ratten

Bei drei SHRSP-Tieren (hyperton) und drei WKY-Kontrolltieren (normoton) wurden zunächst verschiedene Organe auf ihren Gehalt an HSP25 getestet, um erste Hinweise auf unterschiedliche Mengen bei gesunden und an Bluthochdruck leidenden Tieren zu bekommen. Es wurden Gewebeproben aus Niere, Nebenniere, quergestreifter Muskulatur, Aorta, Lunge, Leber, Vorhof, linkem Ventrikel, rechtem Ventrikel, Kleinhirn, Cortex und Hypothalamus untersucht. Abb. 3.16 zeigt den Nachweis von HSP25 auf Western-Blots dieser Proben von jeweils einem normotonen und einem hypertonen Tier. Erste Hinweise für eine unterschiedlich starke Expression von HSP25 ergeben sich hieraus für Nebenniere, Aorta, Lunge, Leber und Herz. Es wird deutlich, daß in den Muskelgeweben HSP25 relativ stark vertreten ist. In der Niere und im Hirngewebe konnte HSP25 nur in sehr geringen Mengen oder gar nicht nachgewiesen werden. Für die weiteren Untersuchungen beschränkte sich die Analyse auf die Herzbereiche rechter Ventrikel, linker Ventrikel und Vorhof sowie Aorta, Nebenniere und Lunge. Analysiert wurde sowohl der Gehalt an HSP25 als auch an HSP70.

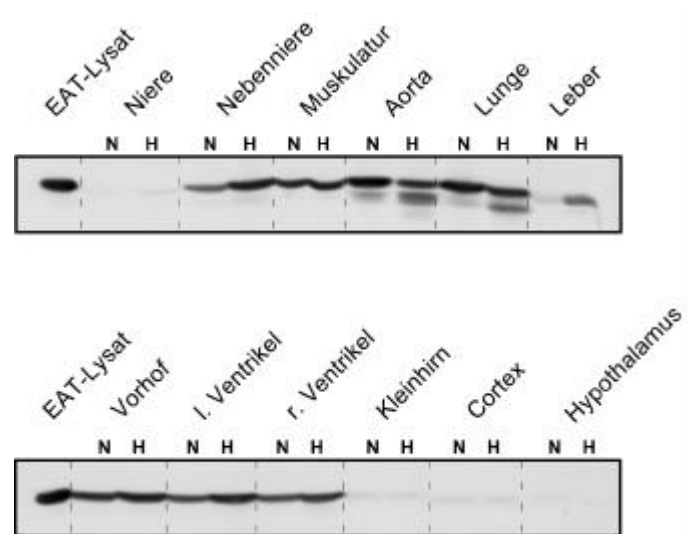


Abb. 3.16: Nachweis von HSP25 in Gewebeproben von normotonen (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHRSP)

Western-Blots der getesteten Gewebe. N = normoton (WKY-Tier), H = hyperton (SHRSP-Tier).

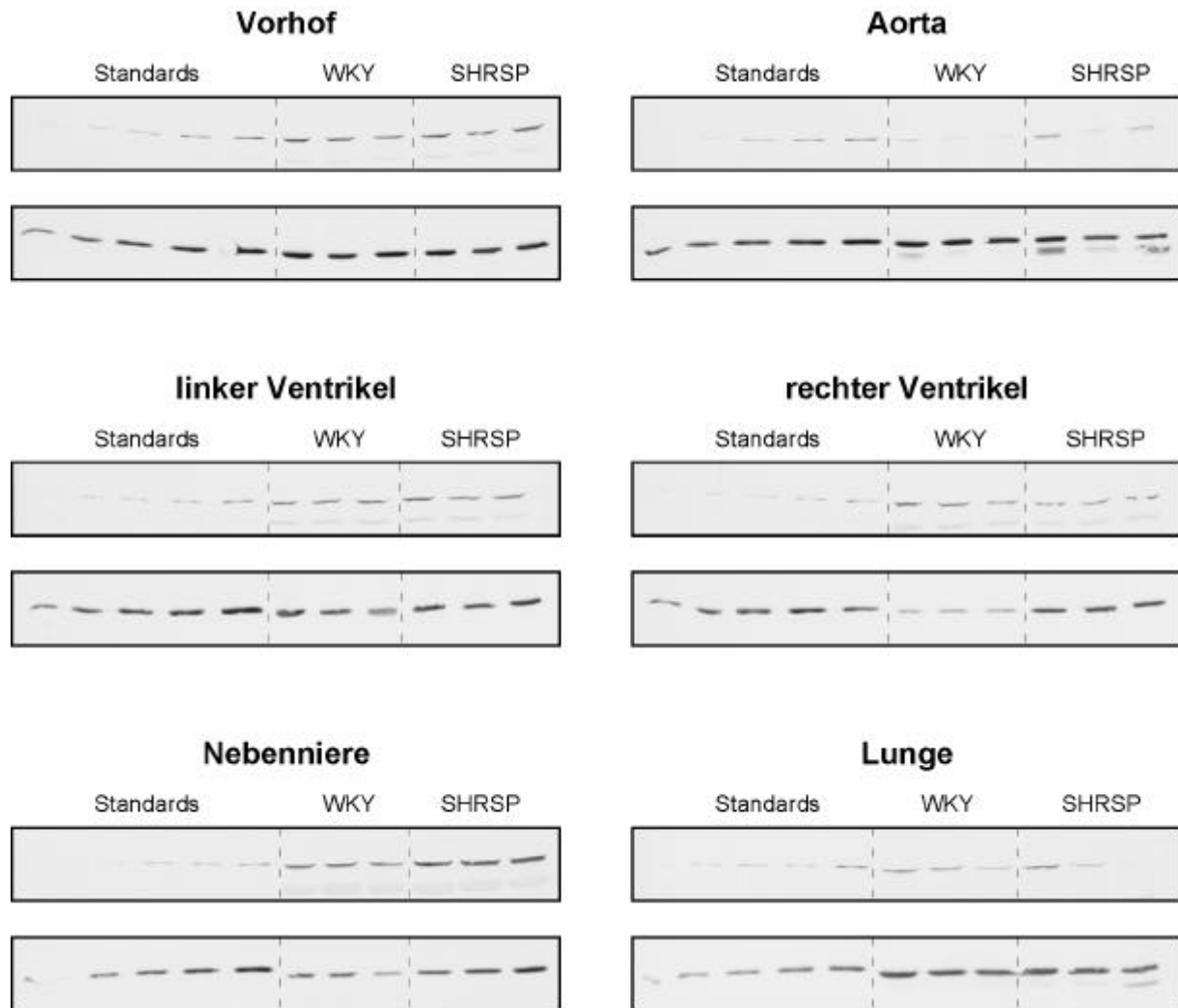


Abb. 3.17: Nachweis von HSP25 und HSP70 in Gewebeproben von normotonen (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHRSP)

Western-Blots der Gewebeproben. In der jeweils unteren Reihe ist der HSP25-Nachweis und in der oberen Reihe der HSP70-Nachweis gezeigt. Die fünf Standards weisen einen HSP25-Gehalt von 7,8 ng bis 19,6 ng im EAT-Zell-Lysat auf. Der Absolutgehalt an HSP70 wurde nicht bestimmt.

Abb. 3.17 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse von spontan hypertensiven Ratten sowohl für HSP25 als auch für HSP70. Die Auswertung der Blots mittels Densitometrie und der Vergleich mit den Standards ist in Tab. 3.7 zusammengefaßt (zur Vorgehensweise bei der Quantifizierung siehe Kapitel 2.4.2). Für HSP25 wurden über die Eichung des Standards Absolutwerte ermittelt. Für HSP70 wurde nur die relative Veränderung berechnet.

Es zeigt sich, daß im rechten Ventrikel und in der Nebenniere der spontan hypertensiven Ratten ein deutlicher Anstieg des HSP25-Gehaltes im Vergleich zu den Kontrollen auftritt. Demgegenüber ist in der Aorta ein Rückgang des HSP25-Gehaltes zu verzeichnen. In den anderen Geweben bleibt der HSP25-Gehalt mehr oder weniger konstant. Bei dem Gehalt an HSP70 sind ebenfalls im rechten Ventrikel und in der Nebenniere deutliche Änderungen zu erkennen. Wäh-

rend, wie bei HSP25, in der Nebenniere der hypertonen Ratten der Gehalt steigt, sinkt der HSP70-Gehalt im rechten Ventrikel ab. Hieraus ergeben sich erste Anhaltspunkte für eine unterschiedliche Funktion der beiden HSPs im Herzen. Demgegenüber sind in den linken Ventrikeln der hypertonen Tiere keine erhöhten Werte an HSP25 oder HSP70 festzustellen. Der Gesamtgehalt an HSP25 ist mit $> 10 \mu\text{g/g}$ FG in den rechten Ventrikeln der normotonen Tiere deutlich niedriger als in den anderen untersuchten Geweben. Bei den hypertonen Tieren erreicht der Gehalt an HSP25 etwa die Werte des linken Ventrikels. Insgesamt kommen die größten Mengen an HSP25 in der Lunge vor. Mit deutlich über $50 \mu\text{g/g}$ FG ist die HSP25-Konzentration hier etwa doppelt so hoch wie in den Herzproben. HSP70 ist auffällig wenig in der Aorta vertreten und ist immer dann in höherer Konzentration vorhanden, wenn der Gehalt an HSP25 eher niedrig ist.

Tab. 3.7: Gehalt an HSP25 und HSP70 in Gewebeproben von normotonen (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHRSP)

Die Mengen sind Mittelwerte von jeweils drei Tieren. Die relative Menge an HSP70 in den Proben bezieht sich auf die in $10 \mu\text{l}$ EAT-Standard enthaltene Menge an HSP70.

	HSP25		HSP70	
	Menge in $\mu\text{g/g}$ Feuchtgewicht		relative Menge	
	WKY	SHRSP	WKY	SHRSP
Aorta	$37,2 \pm 3,6$	$23,5 \pm 4,0$	$0,06 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,00$
Vorhof	$38,5 \pm 8,9$	$31,5 \pm 5,1$	$0,14 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$
rechter Ventrikel	$9,8 \pm 0,2$	$23,0 \pm 0,3$	$0,36 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,01$
linker Ventrikel	$24,4 \pm 5,7$	$26,0 \pm 3,6$	$0,19 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,03$
Nebenniere	$22,2 \pm 3,1$	$31,4 \pm 5,7$	$0,32 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,04$
Lunge	$57,2 \pm 4,3$	$52,8 \pm 2,0$	$0,13 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,05$

3.4.2 Goldblatt-operierte Ratten

Die Goldblatt-Operation kann unter anderem nach der 2kidney-1clip-Methode (2K1C) durchgeführt werden, bei der durch Abklemmen der Nierenarterie die Blutzufuhr zu einer Niere zeitweise unterbrochen wird und dadurch ein Bluthochdruck induziert wird. Sprague-Dawley-Ratten (SD), bei denen diese Operation durchgeführt wurden, repräsentieren das zweite untersuchte Modell der Hypertonie. Auch bei diesen Tieren wurden die Herzbereiche rechter Ventrikel, linker Ventrikel und Vorhof sowie Aorta, Nebenniere und Lunge auf ihren Gehalt an HSP25 und HSP70 untersucht. Zunächst wurde in einem Vorversuch getestet, innerhalb welchen Zeitraumes nach der Operation eine Änderung in dem Gehalt an HSP25 nachweisbar ist. Darum wurden die linken und rechten Ventrikel je eines scheinoperierten und eines Goldblatt-operierten Tieres nach einer Woche und je zwei nach vier Wochen analysiert. In Abb. 3.18 sind die Western-Blots dieser Untersuchung dargestellt. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben der scheinoperierten und denen der 2K1C-operierten Tiere ist nur in dem Blot der rech-

ten Ventrikel vier Wochen nach der Operation zu erkennen. Wie schon im Fall der spontan hypertensiven Ratten war hier der Gehalt an HSP25 bei den normotonen Tieren höher. Bei diesen Tieren erfolgte eine Kontrolle des Blutdruckes, um den Erfolg der Operation bewerten zu können. Er stieg bei den Goldblatt-operierten Tieren in allen Fällen deutlich an. Bei dem nach einer Woche untersuchten Tier war er schon in dieser kurzen Zeit von 116 mmHg auf 168 mmHg angestiegen, wohingegen bei dem Kontrolltier nur ein geringer Anstieg von 122 auf 135 mmHg zu verzeichnen war. Bei den nach vier Wochen untersuchten Tieren war der Blutdruck noch drastischer angestiegen, und zwar auf Werte um 200 mmHg. Dies zeigt, daß sehr schnell nach dem operativen Eingriff die Steigerung des Blutdruckes einsetzte. Die deutlich verstärkte Expression von HSP25 im Herzen setzt jedoch erst wesentlich später ein.

Nach diesen Ergebnissen wurden auch die anderen Organe von Tieren untersucht, bei denen die Operation 4 Wochen zurücklag. In Abb. 3.19 sind die Western-Blots dieser Versuche gezeigt und in Tab. 3.8 ist die densitometrische Auswertung der Banden dieser Blots zusammengefaßt. Es ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den spontan hypertensiven Tieren. Vor allem die erhöhte Menge von HSP25 im rechten Ventrikel der hypertonen Tiere findet sich, wie schon bei den Vorversuchen, auch bei diesen Proben. In diesem Fall gingen damit allerdings auch gesteigerte Werte für HSP70 einher. In allen anderen untersuchten Geweben fanden sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den normotonen und den hypertonen Tieren. Die absoluten Mengen an HSP25 im Herzen waren denen der SHRSP-Tiere sehr ähnlich, aber in der Aorta und in der Lunge fielen sie hier nur etwa halb so groß aus.

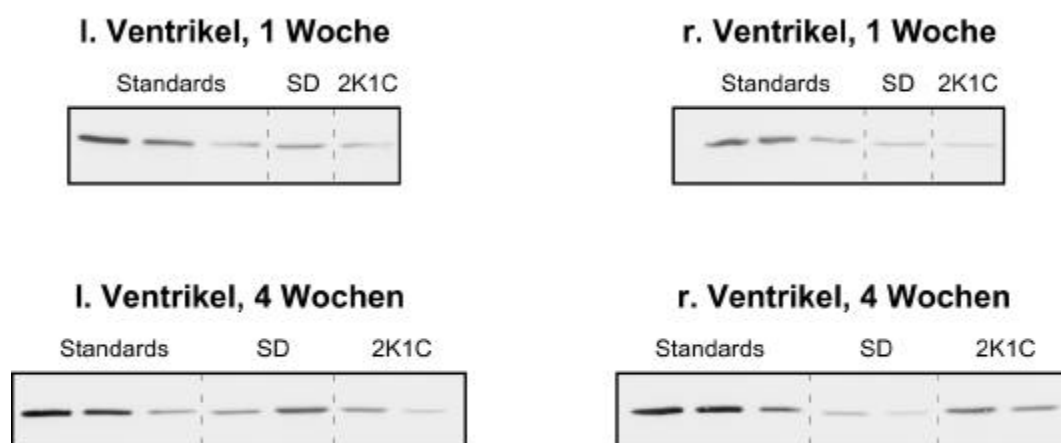


Abb. 3.18: Nachweis von HSP25 in linken (l.) und rechten (r.) Ventrikeln von Goldblatt-operierten (2K1C) und scheinoperierten Sprague-Dawley-Ratten (SD) nach verschiedenen Zeiten

Western-Blots der Gewebeprobe. Die drei Standards weisen einen HSP25-Gehalt von 9,8 ng bis 31,3 ng im EAT-Zell-Lysat auf. Der Absolutgehalt an HSP70 wurde nicht bestimmt.

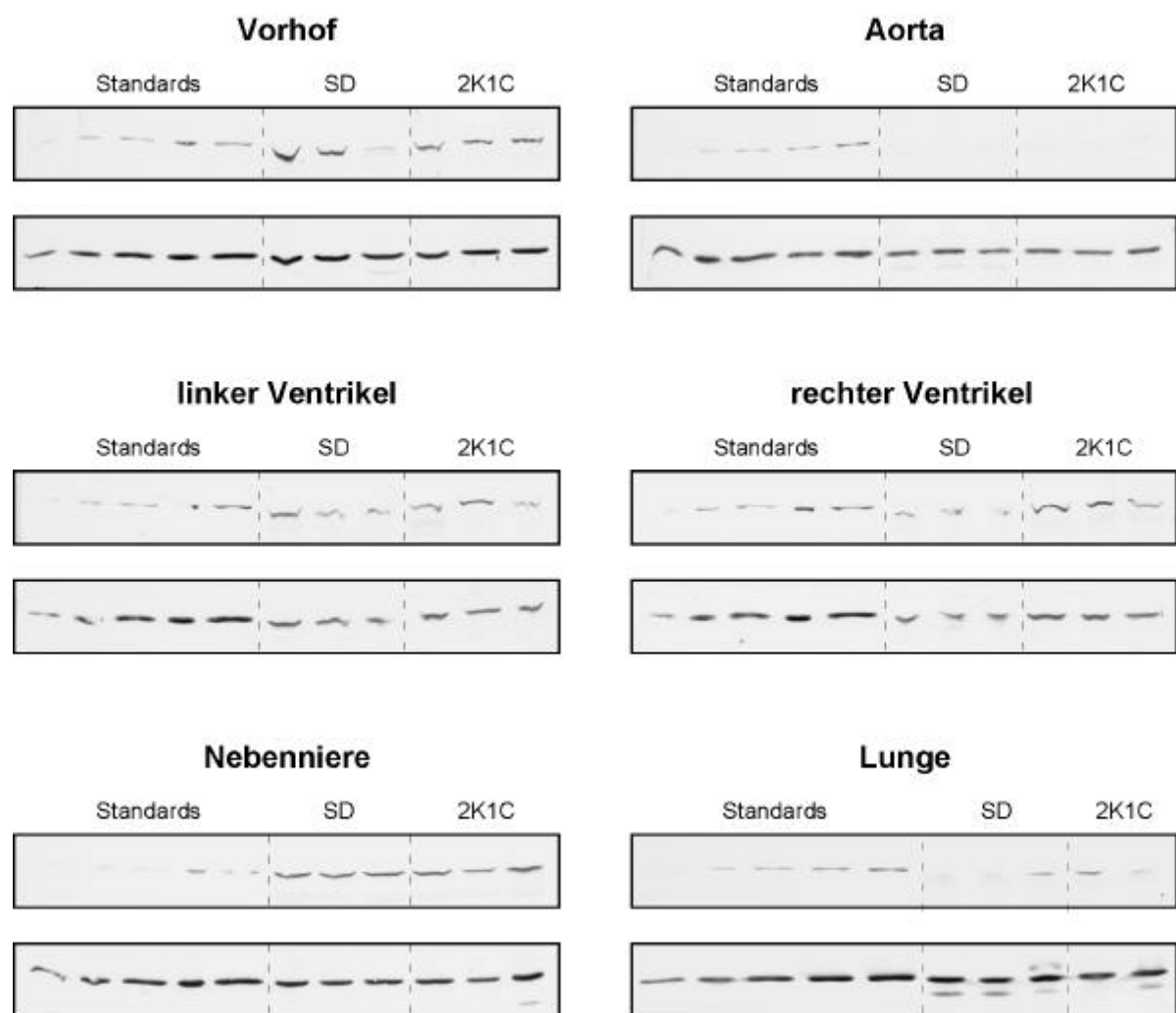


Abb. 3.19: Nachweis von HSP25 und HSP70 in Gewebeproben von Goldblatt-operierten (2K1C) und scheinoperierten Sprague-Dawley-Ratten (SD)

Western-Blots der Gewebeproben 4 Wochen nach der Operation. In der jeweils unteren Reihe ist der HSP25-Nachweis und in der oberen Reihe der HSP70-Nachweis gezeigt. Die 5 Standards weisen einen HSP25-Gehalt von 7,8 ng bis 19,6 ng im EAT-Zell-Lysat auf. Der Absolutgehalt an HSP70 wurde nicht bestimmt.

Tab. 3.8: Gehalt an HSP25 und HSP70 in Gewebeproben von Goldblatt-operierten (2K1C) und scheinoperierten Sprague-Dawley-Ratten (SD)

Die Mengen sind Mittelwerte von jeweils drei Tieren. Die relative Menge an HSP70 in den Proben bezieht sich auf die in 10 µl EAT-Standard enthaltene Menge an HSP70.

	HSP25		HSP70	
	Menge in µg/g Feuchtgewicht		relative Menge	
	SD	2K1C	SD	2K1C
Aorta	15,4 ± 2,1	16,0 ± 1,9	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Vorhof	30,7 ± 3,6	31,3 ± 8,1	0,21 ± 0,14	0,18 ± 0,02
rechter Ventrikel	17,7 ± 0,9	23,5 ± 1,4	0,08 ± 0,01	0,16 ± 0,03
linker Ventrikel	22,4 ± 6,3	20,6 ± 2,2	0,12 ± 0,06	0,11 ± 0,03
Nebenniere	24,5 ± 2,9	22,5 ± 2,5	0,80 ± 0,08	0,68 ± 0,17
Lunge	27,4 ± 3,3	28,8 ± 1,8	0,06 ± 0,02	0,10 ± 0,05

3.4.3 Transgene Ratten mit zusätzlichem Renin-Gen

Da für HSP25 in den beiden bisher getesteten Tiermodellen für die Hypertonie ein deutlich gesteigertes Vorkommen nur im rechten Ventrikel festgestellt wurde, blieb der Nachweis von Streßproteinen in diesem Modell auf den rechten und den linken Ventrikel beschränkt. Die zur Verfügung stehenden Tiere waren ca. zwei Monate alt und als Kontrolle dienten Ratten vom Sprague-Dawley-Stamm (SD). Um das Ausmaß präparationsbedingter Unterschiede in der Menge des nachgewiesenen Proteins abschätzen zu können, wurden hier von jedem Ventrikel der drei Kontroll- und drei transgenen Tiere zwei Präparate aufgearbeitet wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Die Ergebnisse des Nachweises von HSP25 und HSP70 in den Ventrikeln von TGR(mREN2)27- und SD-Tieren sind in Abb. 3.20 dargestellt. Zwischen den beiden Präparaten der gleichen Gewebeprobe finden sich keine gravierenden Unterschiede. Das bestätigt die Zuverlässigkeit der angewendeten Methodik. Im Gegensatz zu den beiden anderen Modellen des Bluthochdrucks ist hier im rechten Ventrikel kein signifikanter Unterschied zwischen den normotonen und hypertonen Tieren festzustellen. Die Absolutwerte für HSP25 bewegen sich mit 28 bis 30 $\mu\text{g/g}$ FG im gleichen Bereich wie bei den anderen Modellen (Tab. 3.10). Interessanterweise sind bei den TGR(mREN2)27-Tieren die relativen Herzgewichte Herzgewicht/Tiergewicht, Tab. 3.9) nicht wesentlich höher als bei den SD-Kontrolltieren.

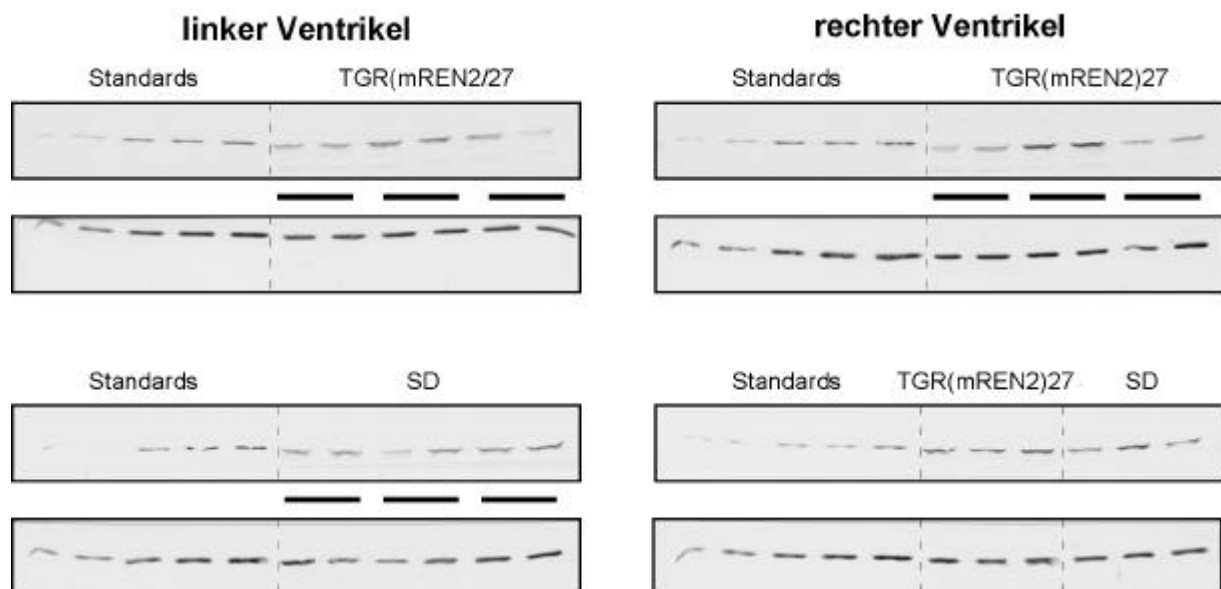


Abb. 3.20: Nachweis von HSP25 und HSP70 in Ventrikeln von TGR(mREN2)27- und Sprague-Dawley-Ratten (SD)

Western-Blots der Gewebeprobe. In der jeweils unteren Reihe ist der HSP25-Nachweis und in der oberen Reihe der HSP70-Nachweis gezeigt. Die 5 Standards weisen einen HSP25-Gehalt von 7,8 ng bis 19,6 ng im EAT-Zell-Lysat auf. Der Absolutgehalt an HSP70 wurde nicht bestimmt. Jeweils zusammengehörende Präparate einer Ventrikelprobe zur Doppelbestimmung der HSP25-Menge sind durch einen Balken gekennzeichnet.

Tab. 3.10: Tier- und Herzgewichte von TGR(mREN2)27- und Sprague-Dawley-Ratten (SD)

Tier	Tiergewicht (g)	Herzgewicht (g)	Herzgewicht/Tiergewicht (%)
SD-1	223	1,03	0,46
SD-2	225	1,00	0,44
SD-3	215	1,02	0,47
TGR(mREN2)27-1	282	1,10	0,39
TGR(mREN2)27-2	250	1,20	0,48
TGR(mREN2)27-3	260	1,27	0,49

Tab. 3.9: Gehalt an HSP25 und HSP70 in Ventrikeln von TGR(mREN2)27- und Sprague-Dawley-Ratten (SD)

Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der gemittelten Werte wieder. Die relative Menge an HSP70 in den Proben bezieht sich auf die in 10 µl EAT-Standard enthaltene Menge an HSP70.

	HSP25		HSP70	
	Menge in µg/g Feuchtgewicht		relative Menge	
	SD	TGR(mREN2)27	SD	TGR(mREN2)27
rechter Ventrikel	28,4 ± 2,5 (3)	30,0 ± 2,8 (9)	0,27 ± 0,05 (3)	0,18 ± 0,10 (9)
linker Ventrikel	28,1 ± 6,1 (6)	30,0 ± 2,5 (6)	0,10 ± 0,02 (6)	0,11 ± 0,03 (6)

Eine Zusammenfassung der Unterschiede im HSP-Gehalt von Herzgeweben und Aorta zwischen normotonen und hypertonen Ratten der drei Modelle findet sich in Tab. 3.11. Die Analyse der Gewebeproben ergibt signifikante Unterschiede in der Expression von HSP25 zwischen den normotonen und den hypertonen Tieren der jeweiligen Tiermodelle vor allem im Bereich der rechten Herzkammer. Der Gehalt an HSP25 ist bei den spontan hypertensiven Ratten und bei den 2K1C-Tieren um ca. 30 bis 130% erhöht und erreicht Werte von 23 bis 30 µg/g Feuchtgewicht. Ähnliche Werte liegen für den linken Ventrikel bei allen Modellen vor, aber ohne eine erkennbare Steigerung bei den hypertonen Tieren. Bei den transgenen Tiere konnte zwar keine deutlich gesteigerte HSP25-Akkumulation im rechten Ventrikel beobachtet werden, jedoch liegen die Absolutwerte hier mit 30 µg/g Feuchtgewicht ebenso hoch wie bei den anderen Modellen. Der Gehalt an HSP25 im Vorhof war bei den untersuchten Modellen immer ca. 50% höher als in den Ventrikeln. Bei den Proben aus der Aorta und der Lunge war der HSP25-Gehalt sehr uneinheitlich. Hier ließ sich keine Beziehung zwischen dem physiologischen Zustand des Tieres und der Menge an HSP25 erkennen.

Für HSP70 ergab sich ebenfalls kein einheitliches Bild bei dem Nachweis des Gehaltes in den verschiedenen Geweben unter jeweils normotonen und hypertonen Bedingungen. Auffällig ist der hohe relative Gehalt an HSP70 in den Nebennieren und die Verminderung des Gehaltes in

den rechten Ventrikeln bei den spontan hypertensiven und den transgenen Tieren. Demgegenüber steht die parallele Steigerung im Gehalt an HSP25 und HSP70 bei den Goldblattoperierten Ratten.

Tab. 3.11: Relative Unterschiede im HSP-Gehalt von Herzgewebe und Aorta zwischen normotonen und hypertonen Ratten der drei Hypertonie-Modelle

Zugrunde gelegt wurden die Mittelwerte der Mengen an HSP25 bzw. HSP70, wie sie in den Tabellen 3.7 bis 3.9 aufgelistet sind. Bezugspunkt ist jeweils der Mittelwert der Proben der normotonen Tiere. n.b. = nicht bestimmt.

Modell	linker Ventrikel		rechter Ventrikel		Vorhof		Aorta	
	HSP25	HSP70	HSP25	HSP70	HSP25	HSP70	HSP25	HSP70
WKY/SHRSP	1,06	1,13	2,36	0,53	0,82	0,95	0,63	1,39
SD/2K1C	0,92	0,89	1,33	1,99	1,02	0,85	1,04	1,02
SD/TGR(mREN2)27	1,07	1,11	1,06	0,65	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

4 Diskussion

4.1 Isolierung und strukturelle Charakterisierung von HSP25

Streßproteine spielen sowohl im normalen Zellstoffwechsel als auch unter unphysiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Um ungünstige Situationen überstehen zu können, benötigen Zellen Mechanismen, mit deren Hilfe sie die lebenswichtigen Funktionen aufrechterhalten oder reparieren können. Ein Teil dieser Aufgaben wird von den Streßproteinen übernommen, indem sie die irreversible Aggregation von denaturierten Proteinen verhindern und ihre Rückfaltung in den nativen Zustand unterstützen. Unter physiologischen Bedingungen kommen diese Chaperoneigenschaften der Streßproteine bei der Faltung neu synthetisierter Proteine oder der Translokation von Proteinen zwischen Zellkompartimenten zum Tragen. Auch das kleine Hitzeschockprotein der Säuger (HSP25) zeigt auf zellulärer Ebene eine thermoprotektive Wirkung (Knauf *et al.*, 1992; Landry *et al.*, 1989) und ist in der Lage, als Chaperon zu fungieren (Jakob *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den gut untersuchten Proteinen aus der HSP60-Familie konnte die Quartärstruktur der HSP25-Komplexe bislang nicht aufgeklärt werden. Ein Einblick in die Struktur der Komplexe könnte große Fortschritte bei der Beantwortung der Frage nach dem Mechanismus der Chaperonaktivität bringen. Da bekannt war, daß rekombinant dargestelltes HSP25 in *E. coli* in *inclusion bodies* angereichert wird, und somit möglicherweise der nativen Form nur begrenzt ähnelt, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zunächst eine schonende Methode zur Aufreinigung des Proteins aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen etabliert. Damit stand für die nachfolgende strukturelle und funktionelle Untersuchungen neben dem rekombinanten Protein auch eine native Form des Proteins zur Verfügung.

Zu Beginn der Arbeiten zur Isolation von HSP25 lagen bereits einige Vorkenntnisse zum Reinigungsverhalten des Proteins vor. Miron *et al.* (1988) beschrieben die Isolierung von HSP25 aus Truthahnmuskulatur und Benndorf *et al.* (1992) aus EAT-Zellen. In Anlehnung an diese Arbeiten erfolgte die Isolierung des Proteins durch Ammoniumsulfatfällung und mehrere Chromatographieschritte. HSP25 wurde bis zur Homogenität gereinigt und konnte mittels eines spezifischen Antikörpers identifiziert werden. Wichtig war die Aufreinigung in wenigen Schritten und der Verzicht auf Substanzen, die die native Struktur der HSP25-Komplexe stark beeinflussen könnten, wie z.B. Detergenzien. Daß nicht alle Chromatographie-Techniken für die Isolierung von HSP25-Komplexen geeignet sind, zeigten die Vorarbeiten mit der Mono P-Säule. Das Protein lag nach der Elution von dieser Säule kaum noch in Form größerer Komplexe vor ($s_{20,w}$ -Wert ca. 6,0) und war außerdem inaktiv bei den Versuchen zur Hemmung der Actinpolymerisation. Verantwortlich für diesen Effekt ist vermutlich eine Denaturierung des Proteins bei der Chromatofokussierung. Im Verlauf des pH-Gradienten wird der isoelektrische Punkt des Proteins durchschritten, d.h. seine Nettoladung beträgt Null. Dies ist ein kritischer Zustand im Hinblick auf das Löslichkeitsverhalten in wäßrigen Medien und kann zu einer Denaturierung und damit zum Ausfallen des Proteins führen. Für eine Empfindlichkeit kleiner

HSPs gegenüber Ladungsschwankungen sprechen auch Untersuchungen mit Spin-Markierungen am α -Crystallin, nach denen Berengian *et al.* (1997) postulierten, daß die konservierte Verteilung der Ladungen in der α -Crystallin-Domäne für das Assemblieren der Oligomere von großer Bedeutung ist.

Im Anschluß an die Aufreinigung des Proteins aus EAT-Zellen erfolgte eine Trennung der hochmolekularen Komplexe von niedermolekularem Material mittels Zentrifugation und Gelfiltration. Damit stand eine Fraktion von nativen HSP25-Komplexen zur Verfügung, die für die strukturelle Charakterisierung geeignet war. Die Struktur der HSP25-Komplexe wurde auf elektronenmikroskopischer Ebene mit Hilfe der Negativkontrastierung und durch die Verwendung der Bildverarbeitungs-Software IMAGIC-5 untersucht. Das Programm erlaubt durch die Verwendung von 'Multivariater Statistischer Analyse' und 'Angular Reconstitution' die Klassifizierung von Projektionen zufällig orientierter Moleküle und die Berechnung der dreidimensionalen Struktur mit hoher Auflösung und wurde schon erfolgreich bei der Rekonstruktion von verschiedenen symmetrischen und asymmetrischen Partikeln aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen angewendet (Dube *et al.*, 1995; Schatz *et al.*, 1995; Serysheva *et al.*, 1995; Stark *et al.*, 1995).

Bei der vorliegenden Untersuchung konnte aufgrund der bevorzugten Orientierung der HSP25-Komplexe keine dreidimensionale Struktur berechnet werden, aber die ringförmige Organisation der Komplexe mit geradzahligter Symmetrie (zwei-, vier- oder achtfach) geht aus den Klassenmitteln der Ansichten klar hervor. Durch den Einsatz hydrodynamischer Methoden konnten die einzelnen Spezies der HSP25-Komplexe weiter charakterisiert werden. Sie sind demnach Mitglieder einer polymer homologen Reihe, deren Struktur vom globulär kompakten Aufbau abweicht. Die Kombination der Daten aus Elektronenmikroskopie, Bildverarbeitung und Hydrodynamik erlaubte die Ableitung eines Modells für den Aufbau von nativem HSP25, bei dem die Komplexe aus vier gestapelten Ringen mit je acht Monomeren bestehen (siehe Abb. 3.6). Die Ergebnisse sind bei Behlke *et al.* (1995) dargestellt.

Die supramolekularen Komplexe der kHSPs erscheinen bei der elektronenmikroskopischen Analyse im Allgemeinen als globuläre oder Torus-ähnliche Strukturen mit einem Durchmesser von 10-18 nm (Longoni *et al.*, 1990b; Siezen *et al.*, 1978a; Behlke *et al.*, 1991). Für kHSPs wurden Molekulargewichte von ca. 800 kDa beschrieben (Chen *et al.*, 1994; Bentley *et al.*, 1992; Hockertz *et al.*, 1991; Arrigo und Welch, 1987; Spector *et al.*, 1971) und für die Quartärstruktur der kleinen HSPs existiert schon eine Reihe von Modellen. Für α B-Crystallin wurde aus spektroskopischen und hydrodynamischen Daten zunächst ein Drei-Lagen-Modell postuliert (Bindels *et al.*, 1979; Siezen *et al.*, 1978b). Die Heterogenität und Dynamik der α -Crystallin-Komplexe unter verschiedenen Bedingungen (Siezen *et al.*, 1980; van den Oetelaar *et al.*, 1990) kann jedoch mit diesen Modellen nicht erklärt werden. Aus diesem Grund schlugen Augusteyn und Koretz (1987) eine flexible Micellenstruktur vor, in der alle Untereinheiten gleichmäßig verteilt sind. Schließlich stellte Walsh (1991) einen Kompromiß zwischen dem Drei-Lagen- und dem Micellen-Modell vor, bei dem die innere Lage eine Micelle aus 12 Untereinheiten bildet. Auf der Basis der Beobachtung, daß die rekombinante C-terminale

Domäne von α A-Crystallin zu Tetrameren assemblieren kann (Merck *et al.*, 1992), schlug Wistow (1993) Tetramere als die Grundeinheit der größeren tetraedischen Komplexe vor und entwickelte daraus zwei mögliche stabile Modelle, ein rhombisches Dodekaeder mit 48 Untereinheiten und einen Würfel mit 24 Untereinheiten, um damit der Variabilität in der Struktur der Komplexe Rechnung zu tragen. Erst kürzlich wurde sogar eine Blatt-ähnliche Struktur für α -Crystallin beschrieben, das aus quervernetztem Linsenextrakt isoliert wurde (Stevens *et al.*, 1996). Für andere kleine HSPs, z.B. HSP16.3 aus *Mycobacterium tuberculosis* wird für die supramolekulare Struktur ein spezifischer Aufbau aus Trimeren von Trimeren angenommen (Gesamtmasse: 145 kDa) (Chang *et al.*, 1996). Die rekombinanten pflanzlichen HSP17,7 und HSP18,1 bilden runde und gemischte runde und trianguläre Strukturen mit 10 nm Durchmesser und scheinen aus 12 Untereinheiten zu bestehen (Lee *et al.*, 1995). Für HSP25 sind bezüglich der supramolekularen Struktur wesentlich weniger Daten verfügbar. Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde von Behlke *et al.* (1991) für das rekombinante HSP25 ein Sedimentationskoeffizient von 20-22 erhalten. Aus hydrodynamischen und elektronenmikroskopischen Daten wurde für diese Komplexe eine globuläre Form mit hexagonaler Packung von 32 Untereinheiten abgeleitet.

Das hier vorgestellte Modell der supramolekularen Struktur von nativem HSP25 weist dagegen Ähnlichkeiten mit den multimeren Komplexen von Hitzeschockproteinen der HSP60-Familie und von Proteasomen auf. Für GroEL aus Eubakterien, TF55 und das Thermosom aus Archaeobakterien, HSP60 der Mitochondrien, das Rubisco-bindenden Protein der Chloroplasten und den TCP1-Komplex aus dem Zytosol eukaryotischer Zellen wurde ein Aufbau aus zwei gestapelten Ringen mit je sieben bis neun Molekülen beschrieben (siehe Waldmann *et al.*, 1995, und die darin zitierten Arbeiten). Ähnlich zylinderförmig aufgebaut ist auch das Proteasom, eine ubiquitär vorkommende multikatalytische Protease, die selektiv intrazelluläre Proteine degradiert (zusammengefaßt bei Peters, 1994; Hilt und Wolf, 1996 und Baumeister und Lupas, 1997). Während der hier beschriebenen Arbeiten zur strukturellen Charakterisierung von HSP25 wurde auf der Basis theoretischer Überlegungen auch für α -Crystallin ein GroEL-ähnlicher Aufbau vorgeschlagen, bestehend aus 2 ringförmigen Schichten mit der Fähigkeit, entfaltete Proteine in einem Hohlraum in der Mitte zu binden (Carver *et al.*, 1994; Boyle und Takemoto, 1994).

Für die GroE-Chaperone existieren hochaufgelöste Röntgenkristallstrukturen (Braig *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 1996; Mande *et al.*, 1996). Ihre Ringe bestehen aus je 7 Untereinheiten und hier hat man bereits Vorstellungen zur Funktionsweise bei der Proteinfaltung entwickelt (zusammengefaßt bei Fenton und Horwich, 1997). Bei den HSP60-Chaperonen wurden die Substrate, also die zu faltenden Proteine, in der Kavität der Komplexe lokalisiert (Braig *et al.*, 1994; Langer *et al.*, 1992) und im Proteasom findet die Proteindegradation ebenfalls im Inneren der Komplexe statt (Löwe *et al.*, 1995). Analog dazu könnte die postulierte Aktivität bei der Proteinfaltung auch bei HSP25 im Inneren der zylindrischen Struktur lokalisiert sein. Die unterschiedlich starke Kontrastierung, wie sie bei den negativ kontrastierten Präparaten im zentralen Bereich der HSP25-Komplexe zu beobachten war, könnte damit die Folge einer unterschiedlichen 'Füllung' mit Substratproteinen sein.

Wie schon angedeutet, ist es nicht zu einer Berechnung der dreidimensionalen Struktur des HSP25 auf der Basis der elektronenmikroskopischen Auswertung gekommen, da die vorhandenen Komplexe bevorzugte Orientierungen einnahmen. Eine Ursache dafür ist die verwendete Technik: Bei der Negativkontrastierung können die Partikel mit einer bevorzugten Seite auf den Trägerfolien anheften, z.B. auf Grund ionischer oder hydrophober Wechselwirkungen zwischen bestimmten Regionen der Partikel und den Trägerfolien. In Zukunft ließe sich dieses Problem eventuell mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie lösen. Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Makromolekülen durch schnelles Einfrieren in einer dünnen Schicht vitrifizierten Wassers eingebettet und liegen dann zufällig orientiert vor. Mit Hilfe des IMAGIC-5 Programmes ließe sich von derartigen Präparaten der nativen HSP25-Komplexe eine dreidimensionale Struktur rekonstruieren.

Im Gegensatz zu den aus EAT-Zellen isolierten hochmolekularen HSP25-Komplexen weist die rekombinante Form des Proteins eine kompakte globuläre Struktur auf (Behlke *et al.*, 1991). Ein Grund für die Unterschiede zwischen dem rekombinanten und dem nativen Protein könnten posttranslationale Modifikationen sein, die bei der Expression des Proteins in *E. coli* nicht geleistet werden können, aber auch präparationsbedingte Unterschiede sind denkbar. Da zur Untersuchung der Bedeutung des Phosphorylierungszustandes für die supramolekulare Struktur der Komplexe nicht genügend natives HSP25 zur Verfügung stand, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Struktur der rekombinanten Proteine von Maus und Mensch sowie verschiedene Mutanten untersucht. Die elektronenmikroskopische und statistische Auswertung der HSP25-Wildtyp-Komplexe zeigte unter Berücksichtigung der Fehlerquellen eine gute Größenübereinstimmung mit dem von Behlke *et al.* (1991) aufgestellten Modell für diese Komplexe. Die Analyse der Größenverteilung der supramolekularen Komplexe der verschiedenen Mutanten und der *in vitro* phosphorylierten Variante belegen, daß die Phosphorylierung einen entscheidenden Einfluß auf die Ausbildung dieser Komplexe hat. Während das Wildtyp-Protein hochmolekulare Komplexe relativ homogener Form bildet, werden die Komplexe mit zunehmender Phosphorylierung immer kleiner und unregelmäßiger geformt.

Der Einfluß des Phosphorylierungszustands auf den Oligomerisierungsgrad von kHSPs wurde *in vivo* schon häufig beobachtet. Die Phosphorylierung von HSP25 korrelierte allerdings in Abhängigkeit vom Zelltyp sowie der Art und dem Zeitpunkt der Stimulierung entweder mit einer Dissoziation oder mit einer Vergrößerung der Komplexe. In menschlichen U251-Gliomzellen führte die Behandlung mit Interleukin 1, TNF- α oder Okadasäure sowie chemischer Streß, z.B. durch Arsenit oder Cadmium, zu einer Phosphorylierung und Dissoziation der HSP25-Komplexe (Kato *et al.*, 1994). In Hamster-CCL39-Zellen wurde nach mitogener Stimulierung eine Größenreduktion der Komplexe von transfiziertem menschlichem HSP25 nur im Falle des Wildtyp-Proteins und nicht für eine nichtphosphorylierbare Mutante beobachtet (Lavoie *et al.*, 1995). Demgegenüber beobachteten Mehlen *et al.* (1994) die Dephosphorylierung und anschließende Anreicherung von kleineren Komplexen mit Molekulargewichten unter 200 kDa in der löslichen Phase des Zytoplasmas bei Serum-frei kultivierten HeLa-Zellen. Nach Stimulation der Zellen durch Serumzugabe kam es zu einer raschen Phos-

phorylierung von HSP25 und einem Anstieg der Komplexgröße. Nach einer Behandlung mit TNF- α wurde bei HeLa-Zellen aber auch eine rasche Phosphorylierung und das transiente Auftreten größerer Komplexe (> 700 kDa) verzeichnet. Nach vier Stunden unter TNF- α dissoziierten diese wieder zu kleineren Komplexen (< 200 kDa). Die phosphorylierten Isoformen blieben während des gesamten Prozesses in Komplexen der Größenordnung bis 300 kDa erhalten (Mehlen *et al.*, 1995a).

Nach den bisherigen Ergebnissen, einschließlich der hier präsentierten Daten, scheint die Phosphorylierung von HSP25 die Voraussetzung für eine Dissoziation der multimeren Komplexe zu sein. Im zellulären Kontext spielen eventuell andere Faktoren eine zusätzliche regulatorische Rolle, da die Phosphorylierung allein nicht immer ausreichend für diese Strukturänderung ist. Vorstellbar ist auch die Regulation über eine stufenweise Phosphorylierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für das menschliche HSP25 drei Mutanten mit unterschiedlichem Phosphorylierungsgrad getestet. Hier deutete sich bereits eine graduelle Verkleinerung der Komplexe mit zunehmender Phosphorylierung an, jedoch sind für das menschliche HSP25 mit drei phosphorylierbaren Serinen weitere fünf Varianten der Phosphorylierung denkbar, die für eine weitergehende Analyse zunächst hergestellt werden müßten.

Im Gegensatz zu den Mutanten, die die Phosphorylierung von HSP25 betrafen, war die C-terminal um 18 Aminosäuren verkürzte Mutante in ihrem Oligomerisierungsverhalten kaum verändert. Dieser Bereich hat demnach keinen essentiellen Einfluß auf die Struktur der Komplexe. Nach H1-NMR-Untersuchungen besitzen diese 18 Aminosäuren eine große Flexibilität unabhängig vom übrigen Protein (Carver *et al.*, 1995). Ähnliches wurde auch für α -Crystallin festgestellt, nur ist dort das flexible C-terminale Ende acht (α A-Crystallin) bzw. zehn (α B-Crystallin) Aminosäuren lang (Carver *et al.*, 1990). Mit NMR-Methoden konnte ebenfalls gezeigt werden, daß diese Bereiche des α -Crystallins weder an intra- noch an intermolekularen Kontakten beteiligt sind (Le Breton und Carver, 1996; Carver *et al.*, 1990). In der C-terminalen Hälfte der kHSPs sind die Enden im Vergleich zur α -Crystallin-Domäne wesentlich weniger konserviert, aber im Allgemeinen sind sie von polarer Natur. Daher postulierten Smulders *et al.* (1996) und Le Breton und Carver (1996) für das flexible C-terminale Ende eine Rolle bei der Vermittlung der Löslichkeit der überwiegend hydrophoben Proteine. Die gleiche Funktion schlugen Leroux *et al.* (1997) nach hydrodynamischen, chromatographischen und Quervernetzungs-Studien an einem kleinen HSP aus *C. elegans* (HSP16-2) vor, da hier zumindest der überwiegende Teil des C-terminalen Endes weder die Multimerisierung noch die Chaperoneigenschaften beeinflusste. Daneben konnten diese Autoren zeigen, daß der nicht konservierte N-terminale Bereich für die Assemblierung der Untereinheiten notwendig ist. Die gleiche Gruppe beschrieb mit einem anderen kHSP aus *C. elegans* (HSP 12.6) erst kürzlich eine neue Klasse von kHSPs. Dieses Protein stellt das bislang kleinste kHSP dar und ist durch seine extrem kurzen N- und C-Termini gekennzeichnet. Interessanterweise ist HSP12.6 nicht in der Lage, oligomere Komplexe *in vivo* auszubilden und besitzt scheinbar auch keine Chaperoneigenschaften. Bei der N-terminalen Domäne spricht vor allem ihr hydrophober Charakter für eine Funktion bei der Assemblierung der Proteine zu supramolekularen Komplexen.

Die in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen Strukturen für das native und das rekombinante HSP25 werfen die Frage nach der eigentlichen Chaperon-Form dieses Hitzeschockproteins auf. Ehrnsperger *et al.* (1997) postulierten für die globulären Komplexe von rekombinantem HSP25 eine Art Auffangfunktion für teilweise entfaltete Proteine, die auf diese Weise vor irreversibler Denaturierung geschützt und in einem faltungskompetenten Zustand bewahrt werden. In Kooperation mit anderen Chaperonen, vornehmlich HSP70, sollte dann in einem energieabhängigen Schritt die Rückfaltung in den nativen Zustand erfolgen. Gestützt wird dieses Modell durch die Tatsache, daß sowohl für das rekombinante HSP25 als auch für die ebenfalls globulären Komplexe des α B-Crystallins Chaperoneigenschaften beschrieben wurden (Horwitz, 1992; Jakob *et al.*, 1993). Auf der anderen Seite legen die zylinderförmigen Komplexe eine Wirkungsweise in Analogie zu dem GroEL/GroES-System der Prokaryoten nahe. Auch hier wäre eine Kooperation mit HSP70 denkbar, über dessen ATPase-Aktivität die Energie für die Faltungsprozesse bereitgestellt werden kann. Möglicherweise wird über die verschiedenen Formen aber auch die Funktion gesteuert. Die mehr globuläre Form könnte in Anlehnung an das Modell von Ehrnsperger *et al.* (1997) eher als unspezifisches Auffangbecken für denaturierte Proteine dienen, wohingegen die zylinderförmige Form in Analogie zum GroEL spezifischer bei der Rückfaltung assistieren könnte. Ob eine derartige Umlagerung überhaupt möglich ist und wie sie reguliert werden könnte, ist im Moment allerdings reine Spekulation. Auch die Frage nach der effektiveren Chaperoneigenschaft konnte hier nicht geklärt werden, da es bisher nicht gelang, die zylinderförmigen Komplexe in ausreichender Menge und Reinheit zu isolieren.

4.2 Hemmung der Actinpolymerisation durch HSP25 und kHSP-Peptide

Die Hemmung der Actinpolymerisation durch HSP25 ist ein besonderer Aspekt der Wechselwirkung von HSP25 mit Actin. In Kapitel 3.3.1 sind Untersuchungen zur Polymerisationshemmenden Wirkung verschiedener kHSPs beschrieben. Durch den Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie und Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß in dieser Hinsicht lediglich das aus EAT-Zellen isolierte native HSP25 eine Aktivität aufweist. Weder α B-Crystallin noch das rekombinante HSP25 der Maus oder des Menschen sind in der Lage, die Polymerisation von Actin zu inhibieren. Auch die Mutanten weisen keine Aktivität auf. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen von Benndorf *et al.* (1994), die zeigten, daß nur unphosphorylierte Monomere von nativem HSP25 in der Lage sind, die Polymerisation von Actin effektiv zu unterbinden, während phosphoryliertes HSP25 und hochmolekulare HSP25-Komplexe inaktiv sind. Als erste hatten Miron *et al.* (1991; 1988) die Beobachtung veröffentlicht, daß das aus der Muskulatur von Truthähnen isolierte HSP25 einen inhibitorischen Effekt auf die Polymerisation von Actin hat. Sie beobachteten außerdem eine Verminderung der Aktivität durch die Tendenz des Proteins, unter nichtreduzierenden Bedingungen zu dimerisieren. Sie charakterisierten HSP25 als ein '*barbed end capping protein*', also als ein Molekül, das am schnell wachsenden Ende des Actinfilaments bindet und damit die Elongation

verhindert. Inzwischen wurde die Hemmung der Actinpolymerisation *in vitro* auch für das kleine Hitzeschockprotein HSP26 der Hefe *S. cerevisiae* nachgewiesen (Rahman *et al.*, 1995).

Da es zur Zeit noch keine Daten zur strukturellen Basis der inhibierenden Wirkung von kHSPs auf die Actinpolymerisation gibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Peptidbibliothek von HSP25 synthetisiert und auf ihre *in vitro* Aktivität als Inhibitor der Actinpolymerisation getestet. Durch den Einsatz von Fluoreszenzspektroskopie und Elektronenmikroskopie konnten zwei Polypeptide identifiziert werden, die die Polymerisation von Actin bei einem 10-fachen (Peptid 6: WSQWFSAAGWPGYVR) bzw. 2,5-fachen (Peptid 11: IRQTADRWRVSLDVN) molaren Überschuß zu 50% inhibieren konnten. Die Aktivitäten dieser Peptide liegen damit etwa ein bis zwei Größenordnungen unter den Werten, wie sie schon für das isolierte Protein erhalten wurden (Miron *et al.*, 1991; Benndorf *et al.*, 1994) und etwa eine Größenordnung über der Effektivität eines Dodekapeptids, das die Actin-bindende Sequenz des Cofilins beinhaltet (Yonezawa *et al.*, 1991). Da die Cofilin-Sequenz in mehreren Actin-depolymerisierenden Proteinen gefunden wurde, postulierten die Autoren, daß diese Sequenz ein allgemeines Motiv für diese Funktion darstellt. Die hier identifizierten Bereiche weisen keine Verwandtschaft zu Sequenzen von Actin-depolymerisierenden Proteinen auf, aber innerhalb der kHSPs sind sie konserviert. Diese Sequenzen könnten also ein für die kHSPs spezifisches Motiv für die Wechselwirkung mit Actin sein. In jedem Fall sind die hier beschriebenen Peptide im Hinblick auf ihre Fähigkeit, die Actinpolymerisation zu hemmen, die bislang effektivsten Peptide. Die Spezifität der Interaktion von Peptid 11 mit Actin wird durch die Tatsache bestätigt, daß ein Zufallspeptid mit der gleichen Aminosäurezusammensetzung keine Aktivität zeigt. Auf der anderen Seite konnten die homologen Sequenzen von Mensch und α B-Crystallin die Actinpolymerisation nicht inhibieren. Daß die menschliche Sequenz lediglich an einer Stelle von der Sequenz des murinen Peptids abweicht, spricht für die Bedeutung des Glutamins an Position 3 des Maus Peptids. Von den bekannten HSP25-Sequenzen der Säuger (Maus, Ratte, Hamster, Huhn, Hund und Mensch) weist lediglich das menschliche Protein ein Histidin an dieser Stelle auf (siehe auch Sequenzvergleich in Abb. 3.13), sonst ist es immer ein Glutamin. Die Sequenz des menschlichen HSP25 wurde von der cDNA und nicht vom isolierten Protein abgeleitet. Da die Codons für Histidin und Glutamin nur an der dritten Stelle voneinander abweichen, ist nicht auszuschließen, daß die Existenz des Histamins an der dritten Position in Peptid 11 auf einer falschen Bestimmung der Sequenz beruht.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß die Aktivität sowohl des menschlichen Peptids 11 als auch der entsprechenden α B-Crystallin-Sequenz durch eine N-terminale Verlängerung wiederhergestellt werden kann und belegen damit den modifizierenden Einfluß des N-terminal zum Peptid 11 gelegenen Bereiches. In diese Region fallen bei dem murinen HSP25 und α B-Crystallin sowie bei dem menschlichen HSP25 ein bzw. zwei phosphorylierbare Serine, wodurch diese Region zusätzlich interessant wird. Durch die Verwendung der verlängerten Peptide mit einer Phosphorylierung an den entsprechenden Serinen konnte ein modulierender Einfluß der Phosphorylierung auf die Funktion als Inhibitor der Actinpolymerisation

gezeigt werden: Die phosphorylierten Peptide wiesen im Vergleich zu den unphosphorylierten Varianten bei allen drei Spezies eine signifikant schlechtere Hemmung der Actinpolymerisation auf. Damit ist es gelungen, die phosphorylierungsabhängige Eigenschaft des gesamten Proteins, als ein Inhibitor der Actinpolymerisation zu fungieren, mit einem kleinen Teilstück nachzuvollziehen und die Phosphorylierungsabhängigkeit dieser Reaktion zu belegen. Im Falle des menschlichen Peptids gelang es sogar, die Aktivität des Peptids durch eine zweifache Phosphorylierung völlig zu unterbinden. Durch diese Ergebnisse wird die Bedeutung der Phosphorylierung von HSP25 bei der Hemmung der Actinpolymerisation eindrucksvoll unterstrichen. Das humane HSP25 und α B-Crystallin sollten nach diesen Ergebnissen ebenfalls die Polymerisation von Actin hemmen können. Bisher wurde die inhibitorische Wirkung jedoch nur für das HSP25 des Huhns und der Hefe belegt (Rahman *et al.*, 1995; Miron *et al.*, 1988). Sowohl das menschliche Protein als auch α -Crystallin wurden bisher nur in Form großer Komplexe isoliert. Das kann in Analogie zum HSP25 der Maus die Ursache für die mangelnde Aktivität bei der Hemmung der Actinpolymerisation sein, denn bei dem Maus-Protein waren nur die unphosphorylierten Monomere aktiv.

Durch eine Reihe von verkürzten Varianten des Peptids 11 konnte die Stelle der Interaktion von HSP25 mit Actin näher charakterisiert werden. Nach den vorliegenden Untersuchungen sollte das Minimalmotiv eines aktiven Peptids zumindest 6 bis 9 Aminosäuren umfassen und die Sequenzmotive IRQ und DVN enthalten. Im Peptid 11 werden diese beiden Motive durch eine Sequenz von 9 Aminosäuren miteinander verbunden, von denen das Element TAD die wichtigste Rolle als Bindeglied zu spielen scheint. Die Lage des Peptids 11 im Gesamtprotein ist in zweifacher Hinsicht interessant. Erstens ist die Nähe zum phosphorylierbaren Serin 86 auffällig - die Bedeutung der Phosphorylierung dieser Aminosäure wurde bereits besprochen - und zweitens liegt Peptid 11 am Beginn der α -Crystallin-Domäne, dem konservierten Bereich, der allen kleinen HSPs gemein ist. Damit zeichnet sich eine mögliche Funktion dieser Domäne ab, wenn auch die am höchsten konservierten Bereiche (Singh *et al.*, 1995) nicht in den Bereich von Peptid 11 fallen. Die phosphorylierbaren Serine liegen außerhalb der α -Crystallin-Domäne, so daß eine Aufteilung des HSP25-Proteins in einen funktionellen und einen regulatorischen Teil denkbar ist.

Peptid 11 besitzt mit drei Argininen und zwei Aspartaten fünf geladene Aminosäuren, ist darum gut wasserlöslich und könnte eine Reihe von ionischen Wechselwirkungen mit Actin eingehen. Demgegenüber ist Peptid 6 mit seinen fünf aromatischen Aminosäuren sehr hydrophob und wohl nur wegen des endständigen Arginins überhaupt in Wasser löslich. Hier dürfte die Wechselwirkung mit Actin vor allem hydrophober Natur sein. Die Experimente mit Zellulose-gebundenen Peptid-Bibliotheken von Actin ergaben als mögliche Interaktionspunkte von HSP25 vor allem die Aminosäurebereiche 156-168 und 194-208 im Actinmolekül. Interessanterweise sind diese Stellen beide an Monomer-Monomer-Wechselwirkungen bei der Filamentbildung des Actins beteiligt. In Abb. 4.1 ist die Struktur des Actin-Monomers wiedergegeben. In dieser Grafik sind auch die Kontaktstellen mit anderen Monomeren im Actinfilament eingezeichnet. Daraus geht hervor, daß die Aminosäuren 156-168 einen Kontaktbe-

reich umfassen, der von den Aminosäuren 166-169 gebildet wird und die Aminosäuren 194-208 werden zum größten Teil durch die beiden Kontaktbereiche 195-197 und 202-204 abgedeckt. Diese drei Bereiche sind in Abb. 4.1 durch Pfeile gekennzeichnet. Der erste Bereich liegt in der dritten Domäne und erstreckt sich über ein β -Faltblatt mitsamt der davor- und dahinterliegenden Loops. Der zweite und dritte Bereich befinden sich am oberen Ende der vierten Domäne und sind Teil eines großen exponierten Loops. Ausgehend von der charakteristischen Ansicht, wie sie von Kabsch *et al.* (1990) gezeichnet wurde, befinden sich diese Bereiche auf der 'Rückseite' des Actinmoleküls, allerdings an gegenüberliegenden Seiten. Erste, hier nicht gezeigte Kompetitionsversuche mit Actinpeptiden dieser Bereiche und den Peptiden 11 und 6 im Actinpolymerisations-Assay scheinen zumindest für die Region des exponierten Loops in Domäne vier eine Interaktion mit Peptid 11 zu bestätigen. Zwei weitere Peptide der Actin-Membran, die mit HSP25 interagiert haben, liegen ebenfalls in einem Actin-Actin-Kontaktbereich. Dies betrifft die Sequenzen 68-80 und 78-90, die beide in der ausgedehnten Kontaktzone der zweiten Domäne (Aminosäuren 68-93) zu finden sind. Hier war die Nachweisreaktion allerdings schwächer und erstreckte sich nicht über mehrere benachbarte Peptidsequenzen. Mit Hilfe der Membran-gebundenen Peptid-Bibliotheken ließen sich also mehrere potentielle Bindungsorte für HSP25 am Actin lokalisieren. Auf der anderen Seite konnten die mit den löslichen Peptiden identifizierten HSP25-Sequenzen mit Actinpolymerisationsinhibitor-Eigenschaft mit dieser Methode nicht detektiert werden. Weitere Versuche zur Optimierung der Technik und parallele Untersuchungen mittels Fluoreszenzfluorometrie und Elektronenmikroskopie sollten in Zukunft in der Lage sein, die Bestimmung der Kontaktbereiche von HSP25 am Actin zu präzisieren.

Die hydrodynamische Untersuchungen bestätigten die Spezifität der Wechselwirkung zwischen Peptid 11 und G-Actin und ließen außerdem eine Abschätzung der Assoziationskonstante von $3,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ zu. Dies belegt eine schwache, aber signifikante Interaktion von Peptid 11 mit G-Actin. Außerdem sprechen die hydrodynamischen Untersuchungen für die biologische Aktivität des Peptids, da keine Selbstassoziate gefunden wurden.

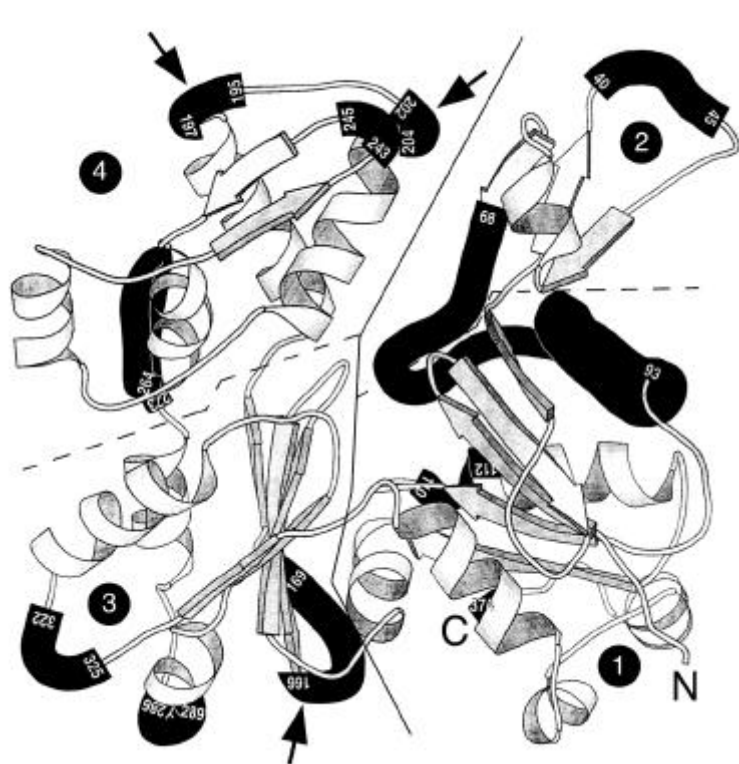


Abb. 4.1: Struktur von monomerem Actin

Darstellung der Kontaktstellen des Actin-Monomers nach Kabsch *et al.* (1990) mit anderen Monomeren im Actinfilament (modifiziert auf der Grundlage einer Zeichnung von dos Remedios und Moens, 1995). Die schwarzen Bänder repräsentieren die Kontaktstellen und die weißen Zahlen darin deuten die Aminosäuren an, die den Anfangs- und Endpunkt der Kontakte bilden. Die durchgezogene Linie kennzeichnet die Trennung der sogenannten 'großen' (links) von der 'kleinen' (rechts) Untereinheit. Die gestrichelten Linien markieren die Aufteilung dieser Untereinheiten in die vier Domänen. Die Pfeile deuten auf die Bereiche des Actin-Moleküls, die nach den Ergebnissen des Peptid-Epitop-Scannings als Interaktionsbereiche mit HSP25 in Frage kommen.

Die hier präsentierten Daten zur Hemmung der Actinpolymerisation durch HSP25-Peptide stellen den ersten direkten Beleg für eine Interaktion von HSP25 mit Actin dar. Bei *in vitro* Untersuchungen mit isolierten Proteinen kann die Existenz von hochaktiven Proteinen als Kontamination nicht ausgeschlossen werden und *in vivo* Untersuchungen sind prinzipiell von indirekter Natur. Die Ergebnisse bestätigen die Befunde anderer Untersuchungen, nach denen HSP25 phosphorylierungsabhängig als Inhibitor der Actinpolymerisation fungieren kann. *In vivo* wird die Regulation des Actinfilamentnetzwerkes neben HSP25 von einer Reihe anderer Proteine beeinflusst. Die Aufklärung der speziellen Funktion von HSP25 im Zusammenspiel mit diesen Proteinen bleibt das Ziel weitergehender Untersuchungen.

4.3 Vorkommen von HSP25 und HSP70 bei Hypertonie

Veränderungen im Vorkommen von HSPs bei pathophysiologischen Zuständen, wie sie z.B. bei einer ausgeprägten Hypertonie zu erwarten sind, können für klinische Fragestellungen von großem Interesse sein. In einer Reihe von Untersuchungen konnte bereits die Bedeutung von HSPs, insbesondere HSP70, für die Funktion des Herzens unter unphysiologischen Bedingungen nachgewiesen werden (Mestril *et al.*, 1994; Heads *et al.*, 1994; Marber *et al.*, 1995; Plumier *et al.*, 1995; Chi und Mestril, 1996; Mestril und Dillmann, 1995; Suzuki *et al.*, 1997), aber über die Funktion von HSP25 im Herzen ist nur wenig bekannt. In Kapitel 3.4 sind die Ergebnisse des Nachweises von HSP25 und HSP70 in verschiedenen Geweben von drei Tiermodellen der Hypertonie beschrieben. Besonders hoch waren die HSP25-Mengen in den muskulösen Geweben, in der Nebenniere und in der Lunge, also vor allem in Geweben, die besonders viel Actin enthalten oder einen hohen Anteil an Epithelien aufweisen. Eine ähnliche quantitative Verteilung von HSP25 fanden auch Kato *et al.* (1992) bei der Untersuchung menschlicher Gewebeproben. Deutliche Unterschiede im HSP25-Gehalt zwischen den Geweben aus normotonen und hypertonen Tieren wurden in der Aorta, den Ventrikeln und der Nebenniere festgestellt. Im Vergleich zu anderen Studien liegen die Werte des HSP25-Gehalts im Herzen etwas niedriger als z.B. solche wie sie für adulte Mäuse- (Klemenz *et al.*, 1993) und Rattenherzen (Inaguma *et al.*, 1995) berichtet wurden. Allerdings wurde in diesen Fällen eine weniger effektive Methode der Proteinextraktion verwendet.

Insgesamt war ein deutlich variierender Gehalt an HSP25 in den verschiedenen Herzgeweben zu erkennen, was für eine gewebespezifische Funktion des kleinen HSPs im Herzen spricht. Die ventrikuläre Lokalisation von kHSPs wurde erst kürzlich von Lutsch *et al.* (1997) mit Hilfe von Immunfluoreszenz- und Immun-Elektronenmikroskopie untersucht. HSP25 konnte in Kardiomyozyten, Endothelzellen und in Zellen der glatten Muskulatur von Blutgefäßen nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde α B-Crystallin bei dieser Untersuchung nur in den Kardiomyozyten gefunden. Dort waren beide kHSPs in der I-Bande und in der Region der M-Linien lokalisiert. Unterschiedlich stark akkumuliert waren nach dieser Untersuchung HSP25 und α B-Crystallin im Herzen auch zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung. Diese Befunde sprechen für räumlich und zeitlich getrennte Funktionen dieser beiden kleinen HSPs im Herzen.

Die unterschiedliche Veränderung im Gehalt von HSP25 und HSP70 zwischen den Geweben normotoner und hypertoner Ratten deutet auf eine differentielle Regulation von HSP25 und HSP70 bei der durch Hypertonie ausgelösten Belastung im Herzen. In diesem Zusammenhang ist auch der entgegengesetzte Trend bei der Veränderung des Gehalts an HSP25 im Vergleich zu dem von HSP70 bei den spontan hypertensiven bzw. den Goldblatt-operierten Ratten interessant. Dies läßt vermuten, daß bei diesen Tiermodellen unterschiedliche Mechanismen für die Ausbildung der Hypertonie verantwortlich sind und dadurch auch die Expression von Streßproteinen in unterschiedlichem Maße angeregt wird. Eine differentielle Regulation der

HSP25- und HSP70-Expression stellten auch Hoch *et al.* (1996) an hitzegeschockten isolierten Rattenherzen fest: Der HSP25-Gehalt stieg nur im linken Ventrikel, der HSP70-Gehalt aber in beiden Ventrikeln an. In ischämischen Kaninchenherzen konnten auch Heads *et al.* (1995) eine erhöhte Menge an HSP70-mRNA, nicht aber an HSP25-mRNA beobachten. Hier stellt sich die Frage, ob in diesen Fällen die kooperative Chaperonfunktion von HSP25 und HSP70 (Ehrnperger *et al.*, 1997) noch eine Rolle spielt. Diese Chaperonaktivität würde bei dem Recycling von partiell denaturierten Zytoskelettproteinen helfen können. Bei den hier vornehmlich betroffenen Kardiomyocyten könnte allerdings die Zytoskelett-stabilisierende Wirkung von HSP25 im Vordergrund stehen.

In dieser Untersuchung wurde eine deutlich erhöhte Expression von HSP25 bei den spontan hypertensiven und den Goldblatt-operierten Tieren im Bereich der rechten Herzkammer beobachtet. Dieser Befund überrascht insofern, als bei einer Hypertonie primär der linke Ventrikel einer verstärkten Belastung ausgesetzt ist. Die biologische Relevanz des gesteigerten Vorkommens von HSP25 in diesem Teil des hypertonen Rattenherzen bleibt zunächst ungeklärt. Erstaunlich ist auch der bei den Kontrolltieren des transgenen Modells sehr hohe Gehalt an HSP25 im rechten Ventrikel. Eine mögliche Ursache könnte im Alter der Tiere liegen. Die Tiere dieses Modells waren mit zwei Monaten noch relativ jung. Es kann zwar als gesichert gelten, daß die transgenen Tiere auch schon in diesem Alter einen erhöhten Blutdruck aufweisen (Mullins *et al.*, 1990), aber ein entwicklungsabhängig relativ hoher HSP25-Gehalt ist für die Kontrolltiere diesen Alters ebenfalls denkbar und würde damit die zu erwartende Steigerung des Gehaltes im rechten Ventrikel bei den transgenen Tieren kompensieren. Dafür sprechen auch neuere Ergebnisse von Lutsch *et al.* (1997), nach denen der HSP25-Gehalt im Herzgewebe von Ratten mit zunehmendem Alter abnimmt. Allerdings ist nach diesen Untersuchungen der HSP25-Wert der Adulttiere bereits nach etwa 1 Monat erreicht.

Das konstitutive Vorkommen von HSP25 im Herzmuskel steht in Übereinstimmung mit einer wachsende Zahl von Arbeiten, die die Interaktion von HSP25 mit Actin *in vivo* beschreibt. So zeigten Lavoie *et al.* (1993a), daß in 3T3-Zellen, die nach einer Transfektion menschliches HSP25 überexprimierten, die Actinfilamentbündel (Streßfibern) eine erhöhte Stabilität gegen einen durch Hitzeschock und Cytochalasin D verursachten Streß aufwiesen. Postuliert man eine direkte Stabilisierung der Actinfilamente durch HSP25, wäre das überexprimierte Protein in diesen Zellen für die gesteigerte Toleranz gegenüber diesen Streßfaktoren verantwortlich. Außerdem scheint nach Untersuchungen von Smoyer *et al.* (1996) und Welsh *et al.* (1996) HSP25 durch die Regulation des Actinfilamentsystems an der Aufrechterhaltung und der pathophysiologisch bedingten Umorganisation des Zytoskeletts in Podozyten und in den Sertoli-Zellen der Hoden beteiligt zu sein. Darüber hinaus ist HSP25 in glatten Muskelzellen an der anhaltenden Kontraktion der Muskeln nach Bombesin- oder Proteinkinase C-Stimulation beteiligt, eine Funktion, die durch die Interaktion mit Actin vermittelt werden könnte (Bitar *et al.*, 1991). Die Aufrechterhaltung der morphologischen und funktionellen Integrität des kontraktile Apparates und des Zytoskeletts könnte demnach auch im Herzen eine Funktion von HSP25 sein.

Durch eine Vielzahl von Studien am Menschen und an verschiedenen Tiermodellen für Hypertonie konnte nachgewiesen werden, daß Bluthochdruck mit einer myokardialen und vaskulären Hypertrophie verbunden ist (Übersicht bei Folkow, 1982). Die Mechanismen, die für das gesteigerte Wachstum verantwortlich sind, sind unbekannt. Ein Grund für das kardiovaskuläre Wachstum könnte eine veränderte Signaltransduktion und Genexpression in den Herzmuskelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen sein. Eine Verbindung zu den veränderten Gehalten an HSPs in hypertonen Ratten ergibt sich aus der Tatsache, daß die MAP-Kinase durch Angiotensin II in vaskulären glatten Muskelzellen von SHR-, nicht aber in solchen aus WKY-Tieren aktiviert wird. Dies spricht für Unterschiede in der Regulation der MAP-Kinase-Kaskade als Ursache für die gesteigerten zellulären Reaktionen im SHR-Modell der Hypertonie (Lucchesi *et al.*, 1996).

4.4 Modell der Struktur-Funktionsbeziehungen von HSP25

Die zur Zeit verfügbaren Daten zeigen, daß HSP25 mit Actin wechselwirken und als Chaperon fungieren kann. Im Einzelnen gehören zu den Funktionen des kleinen Hitzeschockproteins in der Zelle 1.) die Stabilisierung des Mikrofilamentsystems durch die phosphorylierten Monomere, 2.) die Hemmung der Actinpolymerisation durch die unphosphorylierten Monomere und 3.) die Verhinderung der irreversiblen Denaturierung partiell entfalteter Proteine durch die Chaperonaktivität der (unphosphorylierten) hochmolekularen Komplexe. In dem Modell in Abb. 4.2 ist das Zusammenspiel der beteiligten Faktoren bei den verschiedenen Eigenschaften von HSP25 zusammengefaßt.

Da Actin ein wesentlicher Wechselwirkungspartner von HSP25 ist, sollen hier zunächst kurz die wichtigsten Eigenschaften dieses Proteins rekapituliert werden. Actin findet sich in allen eukaryotischen Zellen. In einer typischen tierischen Nichtmuskelzelle macht es ca. 5% der Gesamtproteinmenge aus. Actinfilamente sind essentiell für viele Formen der Beweglichkeit, einschließlich der Muskelkontraktion und für die Struktur und mechanischen Eigenschaften der zytoplasmatischen Matrix. Ohne Actinfilamente könnte sich z.B. eine tierische Zelle nicht auf einer Oberfläche fortbewegen, größere Partikel phagocytieren oder sich teilen. Actin liegt in der Zelle in nahezu gleichen Mengen unpolymerisiert (G-Actin) und in polymerisierter, filamentöser Form (F-Actin) vor (Sheterline *et al.*, 1995). *In vitro* bleibt Actin nur bei niedriger Ionenstärke (z.B. 0,2 mM Ca^{2+} oder 0,05 mM Mg^{2+}) monomer. Eine Anhebung der Ionenstärke auf physiologische Bedingungen (z.B. 2 mM MgCl_2 und 100 mM KCl) führt innerhalb weniger Minuten zu einer Polymerisation des G-Actins zu mehrere Mikrometer langen Filamenten, wie sie z.B. in Abb. 3.11 A dargestellt sind. In der Zelle wird durch Proteine, die an Actin-Monomere binden (z.B. Thymosin und Profilin) verhindert, daß alle Monomere zu Filamenten polymerisieren. Es existiert noch eine große Zahl anderer Actin-bindender Proteine, von denen die meisten an Actinfilamente binden. Man unterteilt sie nach ihren Funktionen bei der Kontrolle der Organisation des Actinnetzwerkes in verschiedene Gruppen. Actin-

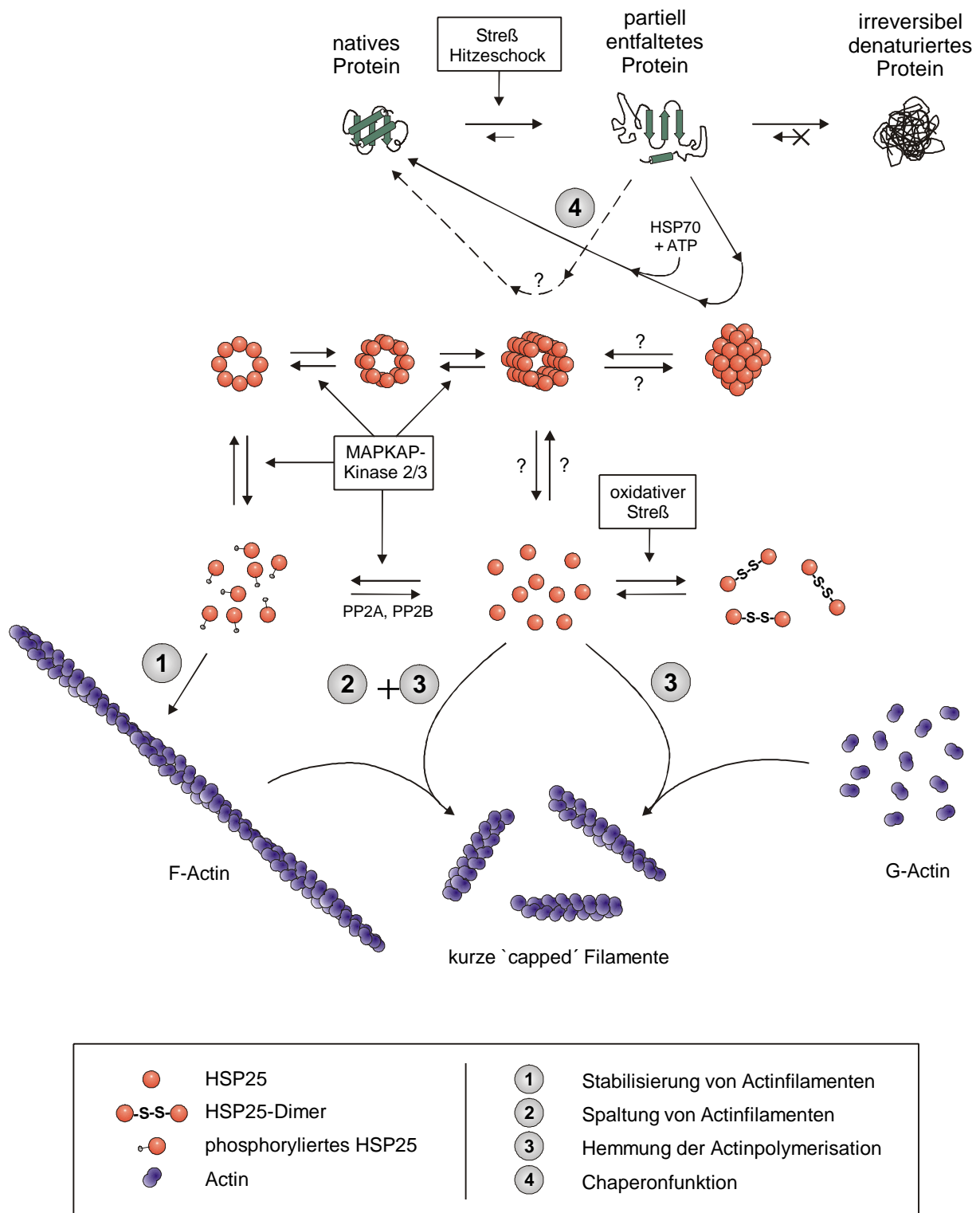


Abb. 4.2: Modell der Struktur-Funktionsbeziehungen von HSP25

Erläuterungen siehe Text.

bündelnde Proteine z.B. halten Actinfilamente in parallelen Bündeln in Form von Mikrovilli zusammen, Actin-Cross-Linking-Proteine sorgen für eine flexible Vernetzung der Actinfilamente untereinander, Actinfilament-spaltende Proteine (wie z.B. Gelsolin) zerschneiden die Actinfilamente in kürzere Stücke, so daß das Actinnetzwerk eine größere Fluidität erlangt und Actin-Capping-Proteine inhibieren die Anlagerung von Monomeren an das Ende der Actinfilamente. Actinfilamente können auch, wie im Muskel, mit Motorproteinen zu kontraktile Bündeln assoziiert sein oder als Schienen für den Transport von Organellen dienen (Zusammenfassung bei Pollard und Cooper, 1986).

Die Interaktion von HSP25 mit Actin auf zellulärer Ebene sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter Streß ist inzwischen gut belegt (siehe Kap. 4.31). Zudem beschrieben Lavoie *et al.* (1993b) den Einfluß der Phosphorylierung von HSP25 auf die Organisation des Zytoskeletts: In Zellen, die konstitutiv HSP25 überexprimierten, war die durch Wachstumsfaktoren induzierte F-Actin-Akkumulation gesteigert, wohingegen die nichtphosphorylierbare Mutante HSP25-S15,78,82G einen negativen Einfluß auf die Actinfilamentbildung hatte. Weitere Beispiele für die Abhängigkeit der protektiven Wirkung von HSP25 vom Phosphorylierungszustand im Hinblick auf die Stabilität des Zytoskeletts finden sich bei Lavoie *et al.* (1995) und Huot *et al.* (1996). In beiden Arbeiten wurde gezeigt, daß der protektive Effekt durch die Phosphorylierungs-inkompetenten Mutanten nicht vermittelbar ist. Nach den hier vorgestellten Untersuchungen zur Struktur und Funktion der HSP25-Mutanten werden durch die zunehmende Phosphorylierung die hochmolekularen HSP25-Komplexe in phosphorylierte niedermolekulare Komplexe oder Monomere überführt. Zur Funktion der phosphorylierten HSP25-Monomere ergeben sich Hinweise aus der Tatsache, daß in hitzegechockten menschlichen Endothelzellen HSP25 mit Actinfasern assoziiert ist und gleichzeitig der Anteil der phosphorylierten HSP25-Isoformen ansteigt (Loktionova *et al.*, 1996). Da die Stabilisierung der Actinfilamente unter Streßbedingungen von der Phosphorylierbarkeit von HSP25 abhängt, ist denkbar, daß die phosphorylierten monomeren HSP25-Moleküle hierfür verantwortlich sind. In Abb. 4.2 ist die Stabilisierung der Actinfilamente durch phosphoryliertes HSP25 unter Punkt 1 der Funktionen von HSP25 eingezeichnet.

Auch Zhu *et al.* (1994) konnten zeigen, daß nur die phosphorylierte Isoform von HSP25 mit der (durch Thrombin induzierten) aktiven Zytoskelettfraktion in menschlichen Blutplättchen assoziiert war. Die Autoren dieser Arbeit beobachteten außerdem, daß nach der Aktivierung der Blutplättchen HSP25 zunächst phosphoryliert und dann von Zytoplasma zum sich organisierenden Zytoskelett transloziert wird. Dies spricht für die These, daß HSP25 in der phosphorylierten Form innerhalb der Zelle transportiert wird. Dies kann auch im Zusammenhang mit der häufig beobachteten Relokalisation von HSP25 vom Zytoplasma in den Zellkern von Bedeutung sein (Beaulieu *et al.*, 1989; Arrigo *et al.*, 1988; Wollgiehn *et al.*, 1994). Wie allerdings der Transport geschieht und wie während des Transportes die Aktivität kontrolliert wird, bleibt offen. Hieran sind in der Zelle vermutlich eine Reihe anderer Proteine beteiligt.

Die phosphorylierten Monomere von HSP25 stabilisieren die Actinfilamente. Um die hemmende Wirkung auf die Actinpolymerisation zu induzieren, müssen die Monomere erst dephosphoryliert werden. Für HSP25 beschrieben Gaestel *et al.* (1992) eine Dephosphorylierung *in vitro* durch die Ca/Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase 2B (PP2B) und Cairns *et al.* (1994) wiesen die Dephosphorylierung *in vivo* durch Proteinphosphatase 2A (PP2A) nach. Zur Regulation der HSP25-Dephosphorylierung liegen bisher keine Daten vor. Die Hemmung der Actinpolymerisation durch die unphosphorylierten, monomeren HSP25-Moleküle durch 'Capping' am schnell wachsenden Ende der Actinfilamente ist in Abb. 4.2 unter Punkt 3 eingezeichnet. Capping-Proteine führen über einen bisher nicht zweifelsfrei geklärten Mechanismus auch immer zu einer Verkürzung, sprich einer Spaltung von Actinfilamenten. Dieser Funktion von HSP25 wird in Abb. 4.2 unter Punkt 2 Rechnung getragen.

Durch welche Mechanismen die unphosphorylierten HSP25-Monomere vor einer erneuten Assoziation zu hochmolekularen Komplexen geschützt werden, bzw. wodurch die Bildung der HSP25-Komplexe ausgelöst wird, ist bislang unbekannt. Arrigo *et al.* (1988) konnten zeigen, daß durch einen Hitzeschock die Bildung hochmolekularer Komplexe angeregt wird. In dem Modell in Abb. 4.2 sind die Übergänge zwischen den verschiedenen strukturellen Zuständen von HSP25 dargestellt. Dabei ist ungeklärt, ob diese Übergänge in der dargestellten Abfolge verlaufen oder ob z.B. unphosphorylierte Monomere direkt zu den hochmolekularen Komplexen assemblieren können. Die Dissoziation der Komplexe verläuft, getrieben durch eine zunehmende Phosphorylierung durch die Streß-induzierte Aktivierung der MAPKAP-Kinasen 2 oder 3, in Richtung der phosphorylierten Monomeren. Die MAPKAP-Kinasen sind Teil einer mehrstufigen Signaltransduktionskaskade, von denen ein Zweig mit der Phosphorylierung von HSP25 endet. Damit ist HSP25 ein Teil des Signaltransduktionssystems, durch den die Zelle auf Veränderungen in ihrer Umgebung mit einer Stabilisierung des Actinfilamentsystems reagiert. Durch die nachgeschaltete Dephosphorylierung von HSP25 kann nach dem Überstehen der Streßperiode die normale Flexibilität des Actinskeletts wiederhergestellt werden.

Ob in der anderen Richtung, also hin zu den unphosphorylierten HSP25-Komplexen noch andere Faktoren als die genannten Phosphatasen eine Rolle spielen, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Unter nichtreduzierenden Bedingungen (Miron *et al.*, 1988) und bei oxidativ gestreßten Zellen (z.B. durch H₂O₂, Benndorf und Bielka, 1997) wurde allerdings eine Dimerisierung von HSP25 beobachtet. Die Funktion der HSP25-Dimere ist unbekannt und sie scheinen, wie in Abb. 4.2 dargestellt, eine strukturelle 'Sackgasse' zu bilden. Da die HSP25-Dimere nach Miron *et al.* (1988) inaktiv bei der Hemmung der Actinpolymerisation sind, könnte die Dimerisierung ein Teilaspekt bei der Regulation des Actinfilamentsystems der Zelle sein. HSP25 kann also als ein Regulator der Organisation des zellulären Actinfilamentsystems am Ende einer Signaltransduktionskaskade betrachtet werden, dessen Aktivität durch den Grad der Phosphorylierung und den Oligomerisierungszustand beeinflusst wird.

Die hochmolekularen Komplexe von HSP25 können zudem als Chaperone fungieren. Die in Abb. 4.2 unter Punkt 4 dargestellte Chaperonaktivität der HSP25-Komplexe bezieht sich im Falle der kompakten globulären Komplexe auf das Modell von Ehrnsperger *et al.* (1997), das bereits in Kap. 4.1 besprochen wurde. Hier fungiert HSP25 als Chaperon, indem es die Umgebung zur Verhinderung der irreversiblen Denaturierung der teilweise entfalteten Proteine anbietet. Die eigentliche Rückfaltungsreaktion wird energieabhängig durch einen weiteren Faktor (HSP70) geleistet. Ob ein ähnlicher Mechanismus auch für die zylinderförmigen HSP25-Komplexe zutreffen könnte, muß erst noch gezeigt werden. In jedem Fall scheint HSP25 ein Teil des Chaperon-Netzwerkes zu sein, durch das die Zelle in der Lage ist, nicht-native Intermediate, die unter Streßbedingungen gehäuft anfallen und zur irreversiblen Aggregation neigen (Hightower, 1980; Ananthan *et al.*, 1986), zu binden und im Zusammenspiel mit anderen Faktoren wieder in den nativen Zustand zu überführen.

HSP25 ist damit ein Beispiel für ein Protein mit vielfältigen Aufgaben sowohl in gestreßten wie auch in ungestreßten Zellen. Die Komplexität der verschiedenen Funktionen und ihrer Regulation kommt in dem Modell in Abb. 4.2 zum Ausdruck und es sollte das Ziel zukünftiger Untersuchungen sein, weitere Einzelheiten der Struktur-Funktionsbeziehungen dieses interessanten Proteins herauszufinden.

5 Zusammenfassung

Hitzeschockproteine übernehmen im Organismus sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei Streß wichtige Funktionen zur Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels. HSP25 ist ein Vertreter der ubiquitär verbreiteten kleinen Hitzeschockproteine, die aufgrund der konservierten α -Crystallin-Domäne eine eigene Familie innerhalb der großen Klasse der Streßproteine bilden. Es ist an der Vermittlung von zellulärer Streßtoleranz beteiligt, besitzt Chaperoneigenschaften und ist in der Lage, die Actinpolymerisation zu inhibieren. HSP25 ist außerdem gekennzeichnet durch seine Fähigkeit, supramolekulare Komplexe auszubilden. Die hier vorgelegte Arbeit befaßte sich mit der Isolierung, strukturellen und funktionellen Charakterisierung des Proteins und seinem Vorkommen in verschiedenen Geweben bei Tiermodellen mit pathologisch erhöhtem Blutdruck.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Methode etabliert, die eine relativ schnelle und schonende Isolierung von HSP25 aus Ehrlich-Ascites-Tumor ermöglicht. Isoliertes HSP25 konnte in mehrere Fraktionen aufgetrennt werden, die sich in bezug auf ihren Assoziationsgrad unterschieden. Durch die Kombination von elektronenmikroskopischen und hydrodynamischen Methoden konnte für die hochmolekularen Komplexe des nativen HSP25 ein Strukturmodell abgeleitet werden. Dieses Modell ist durch eine zylinderförmige Struktur charakterisiert, die aus vier gestapelten Ringen besteht, wobei die einzelnen Ringe je acht HSP25-Monomere enthalten. Die Ähnlichkeit dieser Komplexe mit dem prokaryotischen GroEL-Komplex läßt vermuten, daß die Chaperonaktivität von HSP25 in vergleichbarer Weise durch eine Bindung des Substratproteins im Inneren der Komplexe initiiert wird. Weitere Versuche, möglichst mit Hilfe der Kryomikroskopie, sollten zur weiteren Verfeinerung der dreidimensionalen Struktur dieser HSP25-Komplexe unternommen werden.

Die hochmolekularen Komplexe des rekombinanten HSP25 liegen demgegenüber als kompakte globuläre Strukturen vor. Elektronenmikroskopische Analysen verschiedener Phosphorylierungs-Mutanten und des *in vitro* phosphorylierten rekombinanten HSP25 zeigten, daß die HSP25-Komplexe mit zunehmender Phosphorylierung kleiner werden. Vollständig (dreifach) phosphoryliertes menschliches HSP25 bildet keine hochmolekularen Komplexe mehr. Diese Ergebnisse bestätigen den Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungszustand des Proteins und seiner supramolekularen Organisation.

HSP25 wechselwirkt mit dem Zytoskelettsystem der Zelle. Es ist in der Lage, die Actinpolymerisation zu hemmen und wird mit der Stabilisierung des Mikrofilamentsystems der Zelle in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Untersuchung wurden verschiedene kHSPs hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Actinpolymerisation zu inhibieren, getestet. Mittels Elektronenmikroskopie und Fluoreszenzspektroskopie konnte gezeigt werden, daß das native HSP25 der Maus in der Lage ist, die Polymerisation von Actin zu inhibieren. Rekombinantes HSP25 der Maus und des Menschen, α B-Crystallin aus Kaninchen sowie die verschiedenen HSP25-

Mutanten waren demgegenüber nicht dazu in der Lage. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Struktur der Mutanten bestätigen diese Ergebnisse frühere Befunde, nach denen nur die unphosphorylierten HSP25-Monomere in der Lage sind, die Actinpolymerisation zu inhibieren.

Zur genaueren Analyse dieser Funktion wurde eine Peptidbibliothek von murinem HSP25 synthetisiert. Es konnten zwei Peptide identifiziert werden, die ähnlich wie das Gesamtprotein in der Lage sind, die Actinpolymerisation zu hemmen. Die von den Peptiden umfaßten Regionen enthalten die Aminosäuren 43 bis 57 (Peptid 6: WSQWFSAGWPGYVR) und 92 bis 106 (Peptid 11: IRQTADRWRVSLDVN). Eine 50%-ige Hemmung der Actinpolymerisation wird bei Peptid 6 bei einem 10-fachen und bei Peptid 11 bei einem 2,5-fachen molaren Überschuß zum Actin erreicht. Diese Peptide stellen die bislang effektivsten Peptide mit dieser Funktion dar. Die Resultate belegen erstmals eine direkte Interaktion zwischen HSP25 und Actin. Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge konnte zudem eine spezifische Wechselwirkung zwischen Actin und Peptid 11 nachgewiesen werden.

Durch die Verwendung N-terminal verlängerter Peptid 11-Varianten konnte der Einfluß der Phosphorylierung von einem bzw. zwei Serinen auf die Aktivität der Peptide bestimmt werden. Die phosphorylierten Peptide wiesen im Vergleich zu den unphosphorylierten Varianten immer eine signifikant schlechtere Hemmung der Actinpolymerisation auf. Damit ist es gelungen, die phosphorylierungsabhängige Eigenschaft des gesamten Proteins, als Inhibitor der Actinpolymerisation zu fungieren, mit einem kleinen Teilstück nachzuvollziehen und die Abhängigkeit dieser Reaktion vom Phosphorylierungszustand zu belegen.

Vorläufige Ergebnisse mit Zellulose-gebundenen Peptid-Bibliotheken deuten auf eine Wechselwirkung der Peptid 11-Sequenz von HSP25 mit einem exponierten Loop in Actin-Domäne vier hin. Dieser Bereich ist an Actin-Actin-Kontakten bei der Filamentbildung beteiligt und könnte den Angriffspunkt für die Hemmung der Polymerisation durch HSP25 darstellen. Weitere Untersuchungen mit Actin-Peptiden aus Regionen, die für eine Interaktion in Frage kommen, sollten zur Identifizierung der Interaktionsbereiche zwischen HSP25 und Actin beitragen können.

HSPs haben aufgrund ihrer verstärkten Synthese bei vielen pathologischen Prozessen eine medizinische Relevanz. Untersuchungen an Tiermodellen der Hypertonie ergaben für HSP25 einen hohen Gehalt in muskulösen Geweben, in der Nebenniere und in der Lunge. HSP70 ist besonders stark in der Nebenniere vertreten. Im Zusammenhang mit den Wechselwirkungen zwischen HSP25 und Actin deutet das konstitutive Vorkommen von HSP25 im Herzmuskel auf eine Funktion des Proteins bei der Organisation des kontraktilen Apparats und des Zytoskeletts hin. Eine deutlich erhöhte Expression von HSP25 konnte bei hypertonen Tieren von zwei Modellen im Bereich der rechten Herzkammer beobachtet werden. Die Bedeutung der HSP25-Akkumulation in diesem Bereich sollte durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden. Außerdem sprechen die unterschiedliche Veränderungen im Gehalt von HSP25 und

HSP70 zwischen den Geweben normotoner und hypertoner Ratten für eine differentielle Regulation von HSP25 und HSP70 im Hypertonie-belasteten Herzen.

Die unterschiedlichen Funktionen von HSP25 sind an Veränderungen hinsichtlich der supra-molekularen Organisation und des Phosphorylierungszustandes des Proteins gekoppelt. In einem Modell werden diese Struktur-Funktions-Beziehungen für HSP25 bei der Stabilisierung von Actinfilamenten, der Spaltung von Actinfilamenten, der Hemmung der Actinpolymerisation und der Chaperonfunktion zusammengefaßt.

6 Literaturverzeichnis

- Ananthan, J., Goldberg, A.L., and Voellmy, R. (1986) Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* **232**, 522-524.
- Arrigo, A.P., Suhan, J.P., and Welch, W.J. (1988) Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5059-5071.
- Arrigo, A.P. (1990) Tumor necrosis factor induces the rapid phosphorylation of the mammalian heat shock protein hsp28. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1276-1280.
- Arrigo, A.P. and Landry, J. (1994) Expression and function of the low molecular weight heat shock proteins, in *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. (Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C., eds.). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, 335-373.
- Arrigo, A.P. and Welch, W.J. (1987) Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 15359-15369.
- Atherton, A. and Sheppard, R.C., eds. (1989). *Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.
- Augusteyn, R.C. and Koretz, J.F. (1987) A possible structure for alpha-crystallin. *FEBS Lett.* **222**, 1-5.
- Baumeister, W. and Lupas, A. (1997) The proteasome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 273-278.
- Beaulieu, J.F., Arrigo, A.P., and Tanguay, R.M. (1989) Interaction of Drosophila 27,000 Mr heat-shock protein with the nucleus of heat-shocked and ecdysone-stimulated culture cells. *J. Cell Sci.* **92**, 29-36.
- Behlke, J., Dube, P., van Heel, M., Wieske, M., Hayess, K., Benndorf, R., and Lutsch, G. (1995) Supramolecular structure of the small heat shock protein Hsp25. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **99**:87-93.
- Behlke, J., Lutsch, G., Gaestel, M., and Bielka, H. (1991) Supramolecular structure of the recombinant murine small heat shock protein hsp25. *FEBS Lett.* **288**, 119-122.
- Behlke, J., Ristau, O., and Schönfeld, H.J. (1997) Nucleotide dependent complex formation between the Escherichia coli chaperonins GroEL and GroES studied under equilibrium conditions. *Biochemistry* **36**, 5149-5156.
- Behlke, J. and Ristau, O. (1997) Molecular mass determination by sedimentation velocity experiments and direct fitting of the concentration profiles. *Biophys. J.* **72**, 428-434.
- Benndorf, R., Kraft, R., Otto, A., Stahl, J., Böhm, H., and Bielka, H. (1988a) Purification of the growth-related protein p25 of the Ehrlich ascites tumor and analysis of its isoforms. *Biochem. Int.* **17**, 225-234.
- Benndorf, R., Nürnberg, P., and Bielka, H. (1988b) Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich ascites tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis. *Exp. Cell Res.* **174**, 130-138.
- Benndorf, R., Hayess, K., Stahl, J., and Bielka, H. (1992) Cell-free phosphorylation of the murine small heat-shock protein hsp25 by an endogenous kinase from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1136**, 203-207.
- Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., and Lutsch, G. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 20780-20784.
- Benndorf, R. and Bielka, H. (1997) Cellular stress response: stress proteins--physiology and implications for cancer. *Recent Results Cancer Res.* **143**, 129-144.

- Bentley, N.J., Fitch, I.T., and Tuite, M.F. (1992) The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast* **8**, 95-106.
- Berengian, A.R., Bova, M.P., and McHaourab, H.S. (1997) Structure and function of the conserved domain in alphaA-crystallin. Site-directed spin labeling identifies a beta-strand located near a subunit interface. *Biochemistry* **36**, 9951-9957.
- Bhat, S.P., Horwitz, J., Srinivasan, A., and Ding, L. (1991) Alpha B-crystallin exists as an independent protein in the heart and in the lens. *Eur. J. Biochem.* **202**, 775-781.
- Bielka, H., Hoinkis, G., Oesterreich, S., Stahl, J., and Benndorf, R. (1994) Induction of the small stress protein, Hsp25, in Ehrlich ascites carcinoma cells by anticancer drugs. *FEBS Lett.* **343**, 165-167.
- Bindels, J.G., Siezen, R.J., and Hoenders, H.J. (1979) A model for the achitecture of alpha-crystallin. *Ophthalmic Res.* **11**, 441
- Bitar, K.N., Kaminski, M.S., Hailat, N., Cease, K.B., and Strahler, J.R. (1991) HSP27 is a mediator of smooth muscle concentration in response to bombesin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1192-1200.
- Boelens, W.C. and de Jong, W.W. (1995) Alpha-crystallins, versatile stress-proteins. *Mol. Biol. Rep.* **21**, 75-80.
- Boyle, D. and Takemoto, L. (1994) Characterization of the alpha-gamma and alpha-beta complex - Evidence for an in vivo functional role of alpha-Crystallin as a molecular chaperone. *Exp. Eye Res.* **58**, 9-15.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the uantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 angstrom. *Nature* **371**, 578-586.
- Cairns, J., Qin, S.X., Philp, R., Tan, Y.H., and Guy, G.R. (1994) Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 *in vivo* by protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **269**, 9176-9183.
- Camussi, G., Turello, E., Bussolino, F., and Baglioni, C. (1991) Tumor necrosis factor alters cytoskeletal organization and barrier function of endothelial cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **96**, 84-91.
- Carper, S.W., Rocheleau, T.A., and Storm, F.K. (1990) cDNA sequence of a human heat shock protein HSP27. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6457
- Carver, J.A., Aquilina, J.A., Truscott, R.J., Ralston, G.B., van den Oetelaar, P.J., van Someren, P.F., Thomson, J.A., Siezen, R.J., and Hoenders, H.J. (1990) Identification by 1H NMR spectroscopy of flexible C-terminal extensions in bovine lens alpha-crystallin. A dynamic quaternary structure of bovine alpha-crystallin as indicated from intermolecular exchange of subunits. *FEBS Lett.* **29**, 3488-3493.
- Carver, J.A., Aquilina, J.A., and Truscott, R.J.W. (1994) A possible chaperone-like quaternary structure for alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.* **59**, 231-234.
- Carver, J.A., Esposito, G., Schwedersky, G., and Gaestel, M. (1995) H-1 NMR spectroscopy reveals that mouse hsp25 has a flexible C- terminal extension of 18 amino acids. *FEBS Lett.* **369**, 305-310.
- Caspers, G.J., Leunissen, J.A.M., and de Jong, W.W. (1995) The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved alpha-crystallin domain. *J. Mol. Evol.* **40**, 238-248.
- Chang, Z.Y., Primm, T.P., Jakana, J., Lee, L.H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H.F., and Quiocho, F.A. (1996) *Mycobacterium tuberculosis* 16 kDa antigen (hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. *J. Biol. Chem.* **271**, 7218-7223.
- Chen, Q., Osteryoung, K., and Vierling, E. (1994) A 21-kDa chloroplast heat shock protein assembles into high molecular weight complexes *in vivo* and in organelle. *J. Biol. Chem.* **269**, 13216-13223.

- Chi, S.H. and Mestril, R. (1996) Stable expression of a human hsp70 gene in a rat myogenic cell line confers protection against endotoxin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **39**, C1017-C1021.
- Chiesa, R., Gawinowicz Kolks, M.A., Kleiman, N.J., and Spector, A. (1987) The phosphorylation sites of the B2 chain of bovine alpha-crystallin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 1340-1347.
- Chiesi, M., Longoni, S., and Limbruno, U. (1990) Cardiac alpha-crystallin. III. Involvement during heart ischemia. *Mol. Cell. Biochem.* **97**, 129-136.
- Ciocca, D.R., Puy, L.A., and Fasoli, L.C. (1989) Study of estrogen receptor, progesterone receptor, and the estrogen-regulated Mr 24,000 protein in patients with carcinomas of the endometrium and cervix. *Cancer Res.* **49**, 4298-4304.
- Ciocca, D.R., Oesterreich, S., Chamness, G.C., McGuire, W.L., and Fuqua, S.A. (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 27, 000 (Hsp27): a review. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 1558-1570.
- Cobb, M.H. and Goldsmith, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**, 14843-14846.
- Collier, N.C., Heuser, J., Levy, M.A., and Schlesinger, M.J. (1988) Ultrastructural and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* **106**, 1131-1139.
- Collier, N.C. and Schlesinger, M.J. (1986) The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* **103**, 1495-1507.
- Cooper, J.A., Walker, S.B., and Pollard, T.D. (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**, 253-262.
- Cox, D.J. (1969) Computer simulation of sedimentation in the ultracentrifuge. IV. Velocity sedimentation of self-associating solutes. *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 106-123.
- de Jong, W.W., Leunissen, J.A.M., Leenen, P.J.M., Zweers, A., and Versteeg, M. (1988) Dogfish alpha-crystallin sequences: comparison with small heat shock proteins and *Schistosoma* egg antigen. *J. Biol. Chem.* **263**, 5141-5149.
- de Jong, W.W., Leunissen, J.A., and Voorter, C.E. (1993) Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 103-126.
- Denhardt, D.T., (1996) Signal transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.* 318 Part 3:729-747.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J.H., Ulevitch, R.J., and Davis, R.J. (1995) Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**, 682-685.
- dos Remedios, C.G. and Moens, P.D.J. (1995) Actin and the actomyosin interface - A review. *Biochim. Biophys. Acta* **1228**, 99-124.
- Dube, P., Orlova, E.V., Zemlin, F., van Heel, M., Harris, J.R., and Markl, J. (1995) Three-dimensional structure of keyhole limpet hemocyanin by cryoelectron microscopy and angular reconstitution. *J. Struct. Biol.* **115**, 226-232.
- Dunn, D.K., Whelan, R.D.H., Hill, B., and King, R.J.B. (1993) Relationship of HSP27 and estrogen receptor in hormone sensitive and insensitive cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **46**, 469-479.
- Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., and Buchner, J. (1997) Binding of non native protein to hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**, 221-229.
- Ellis, R.J. (1990) The molecular chaperone concept. *Semin. Cell Biol.* **1**, 1-9.
- Engel, K., Plath, K., and Gaestel, M. (1993) The MAP kinase-activated protein kinase 2 contains a proline- rich SH3-binding domain. *FEBS Lett.* **336**, 143-147.

- Engel, K., Schultz, H., Martin, F., Kotlyarov, A., Plath, K., Hahn, M., Heinemann, U., and Gaestel, M. (1995) Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 by mutation of phosphorylation sites and an A-helix motif. *J. Biol. Chem.* **270**, 27213-27221.
- Fenton, W.A. and Horwich, A.L. (1997) GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci.* **6**, 743-760.
- Folkow, B. (1982) Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol. Rev.* **62**, 347-504.
- Frank, R. (1992) Spot synthesis: an easy technique for the positionally adressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**, 9217-9232.
- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**, 1039-1049.
- Gabai, V.L., Mosina, V.A., Budagova, K.R., and Kabakov, A.E. (1995) Spontaneous overexpression of heat-shock proteins in Ehrlich ascites carcinoma cells during in vivo growth. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **35**, 95-102.
- Gaestel, M., Gross, B., Benndorf, R., Strauss, M., Schunk, W.H., Kraft, R., Otto, A., Böhm, H., Stahl, J., Drabsch, H., and Bielka, H. (1989) Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the 25-kDa growth-related protein of Ehrlich ascites tumor and its homology to mammalian stress proteins. *Eur. J. Biochem.* **179**, 209-213.
- Gaestel, M., Schröder, W., Benndorf, R., Lippmann, C., Buchner, K., Hucho, F., Erdmann, V.A., and Bielka, H. (1991) Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25. *J. Biol. Chem.* **266**, 14721-14724.
- Gaestel, M., Benndorf, R., Hayess, K., Priemer, E., and Engel, K. (1992) Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by calcium/calmodulin-dependent (type 2B) protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**, 21607-21611.
- Gaestel, M., Gotthardt, R., and Müller, T. (1993) Structure and organisation of a murine gene encoding small heat-shock protein Hsp25. *Gene* **128**, 279-283.
- Garcia de la Torre, J., Navarro, S., Lopez Martinez, M.C., Diaz, F.G., and Lopez Cascales, J.J. (1994) HYDRO: a computer program for the prediction of hydrodynamic properties of macromolecules. *Biophys. J.* **67**, 530-531.
- Georgopoulos, C. and Welch, W.J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 601-634.
- Gernold, M., Knauf, U., Gaestel, M., Stahl, J., and Kloetzel, P.M. (1993) Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25. *Dev. Genet.* **14**, 103-111.
- Gething, M.J. and Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Glass, J.R., DeWitt, R.G., and Cress, A.E. (1985) Rapid loss of stress fibers in Chinese hamster ovary cells after hyperthermia. *Cancer Res.* **45**, 258-262.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A.A., and Lorimer, G.H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* **337**, 44-47.
- Gotthardt, R., Neining, A., and Gaestel, M. (1996) The anti cancer drug cisplatin induces Hsp25 in Ehrlich ascites tumor cells by a mechanism different from transcriptional stimulation influencing predominantly Hsp25 translation. *Int. J. Cancer* **66**, 790-795.
- Gragerov, A.I., Martin, E.S., Krupenko, M.A., Kashlev, M.V., and Nikiforov, V.G. (1991) Protein aggregation and inclusion body formation in *Escherichia coli* rpoH mutant defective in heat shock protein induction. *FEBS Lett.* **291**, 222-224.

- Gragerov, A.I., Martin, E.S., Krupenko, M.A., Kashlev, M.V., Nikiforov, V.G., Rudolph, R., and Lilie, H. (1996) Protein aggregation and inclusion body formation in *Escherichia coli* rpoH mutant defective in heat shock protein induction. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FEBS Lett.* **10**, 49-56.
- Groenen, P.J., Merck, K.B., de Jong, W.W., and Bloemendal, H. (1994) Structure and modifications of the junior chaperone alpha-crystallin. From lens transparency to molecular pathology. *Eur. J. Biochem.* **225**, 1-19.
- Hamet, P., Malo, D., and Tremblay, J. (1990) Increased transcription of a major stress gene in spontaneously hypertensive mice. *Hypertension* **15**, 904-908.
- Hamet, P. (1995) Environmental stress and genes of hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **22**, S:394-S 398.
- Hamet, P., Kaiser, M.A., Sun, Y.L., Page, V., Vincent, M., Kren, V., Pravenec, M., Kunes, J., Tremblay, J., and Samani, N.J. (1996) Hsp27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension* **28**, 1112-1117.
- Hayess, K. (1996) Phosphorylierung des kleinen Hitzeschockproteins hsp25 der Säuger: Biochemische Charakterisierung der hsp25-Kinase und phosphorylierungsabhängige Hemmung der Actinpolymerisation. Dissertation. Humboldt-Universität, Berlin.
- Head, M.W., Corbin, E., and Goldman, J.E. (1993) Overexpression and abnormal modification of the stress proteins alpha B-crystallin and Hsp27 in Alexander disease. *Am. J. Pathol.* **143**, 1743-1753.
- Head, M.W., Corbin, E., and Goldman, J.E. (1994) Coordinate and independent regulation of alpha B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress. *J. Cell. Physiol.* **159**, 41-50.
- Heads, R.J., Latchman, D.S., and Yellon, D.M. (1994) Stable high level expression of a transfected human HSP70 gene protects a heart-derived muscle cell line against thermal stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**, 695-699.
- Heads, R.J., Latchman, D.S., and Yellon, D.M. (1995) Differential stress protein mRNA expression during early ischaemic preconditioning in the rabbit heart and its relationship to adenosine receptor function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 2133-2148.
- Hendrick, J.P. and Hartl, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
- Hickey, E., Brandon, S.E., Potter, R., Stein, G., Stein, J., and Weber, L.A. (1986) Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. *Nucleic Acids Res.* **14**, 4127-4145.
- Hightower, L.E. (1980) Cultured animal cells exposed to amino acid analogous or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. Cell. Physiol.* **102**, 407-427.
- Hightower, L.E. (1991) Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* **66**, 191-197.
- Hightower, L.E. and Nover, L., eds. (1991) *Heat Shock and Development*. Springer-Verlag, Berlin.
- Hilt, W. and Wolf, D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 96-102.
- Hoch, B., Lutsch, G., Schlegel, W.P., Stahl, J., Wallukat, G., Bartel, S., Krause, E.G., Benndorf, R., and Karczewski, P. (1996) HSP25 in isolated perfused rat hearts: localization and response to hyperthermia. *Mol. Cell. Biochem.* **160-161**:231-239.
- Hockertz, M.K., Clark Lewis, I., and Candido, E.P. (1991) Studies of the small heat shock proteins of *Caenorhabditis elegans* using anti-peptide antibodies. *FEBS Lett.* **280**, 375-378.
- Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10449-10453.

- Houk, T.W., Jr. and Ue, K. (1974) The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods. *Anal. Biochem.* **62**, 66-74.
- Hunt, J.F., Weaver, A.J., Landry, S.J., Gierasch, L., and Deisenhofer, J. (1996) The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8-angstrom resolution. *Nature* **379**, 37-45.
- Huot, J., Lambert, H., Lavoie, J.N., Guimond, A., Houle, F., and Landry, J. (1995) Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27. *Eur. J. Biochem.* **227**, 416-427.
- Huot, J., Houle, F., Spitz, D.R., and Landry, J. (1996) Hsp27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* **56**, 273-279.
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F., and Landry, J. (1997) Oxidative stress induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen activated protein kinase heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* **80**, 383-392.
- Inaguma, Y., Hasegawa, K., Goto, S., Ito, H., and Kato, K. (1995) Induction of the synthesis of hsp27 and alpha B-crystallin in tissues of heat-stressed rats and its suppression by ethanol or an alpha(1)-adrenergic antagonist. *J. Biochem.* **117**, 1238-1243.
- Ingolia, T.D. and Craig, E.A. (1982) Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 2360-2364.
- Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T., and Kato, K. (1997) Phosphorylation of alpha B-crystallin in response to various types of stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 29934-29941.
- Iwaki, T., Kume Iwaki, A., Liem, R.K., and Goldman, J.E. (1989) Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* **57**, 71-78.
- Iwaki, T., Wisniewski, T., Iwaki, A., Corbin, E., Tomokane, N., Tateishi, J., and Goldman, J.E. (1992) Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. *Am. J. Pathol.* **140**, 345-356.
- Iwaki, T., Iwaki, A., Tateishi, J., Sakaki, Y., and Goldman, J.E. (1993) Alpha B-crystallin and 27-kd heat shock protein are regulated by stress conditions in the central nervous system and accumulate in Rosenthal fibers. *Am. J. Pathol.* **143**, 487-495.
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**, 1517-1520.
- Johnston, R.N. and Kucey, B.L. (1988) Competitive inhibition of Hsp70 gene expression causes thermosensitivity. *Science* **242**, 1551-1554.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., and Holmes, K.C. (1990) Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301.
- Kato, H., Kogure, K., Liu, X.H., Araki, T., Kato, K., and Itoyama, Y. (1995) Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein hsp27 following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* **679**, 1-7.
- Kato, K., Shinohara, H., Kurobe, N., Inaguma, Y., Shimizu, K., and Ohshima, K. (1991) Tissue distribution and developmental profiles of immunoreactive alpha B-crystallin in the rat determined with a sensitive immunoassay system. *Biochim. Biophys. Acta* **1074**, 201-208.
- Kato, K., Shinohara, H., Goto, S., Inaguma, Y., Morishita, R., and Asano, T. (1992) Copurification of small heat shock protein with alpha-B crystallin from human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **267**, 7718-7725.

- Kato, K., Goto, S., Hasegawa, K., and Inaguma, Y. (1993) Coinduction of two low-molecular-weight stress proteins, alpha B-crystallin and HSP28, by heat or arsenite stress in human glioma cells. *J. Biochem. Tokyo*. **114**, 640-647.
- Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S., and Inaguma, Y. (1994) Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J. Biol. Chem.* **269**, 11274-11278.
- Kim, Y.J., Shuman, J., Sette, M., and Przybyla, A. (1984) Nuclear localization and phosphorylation of three 25-kilodalton rat stress proteins. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 468-474.
- Klemenz, R., Fröhli, E., Steiger, R.H., Schäfer, R., and Aoyama, A. (1991) Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3652-3656.
- Klemenz, R., Andres, A.C., Fröhli, E., Schäfer, R., and Aoyama, A. (1993) Expression of the murine small heat shock proteins hsp25 and alpha B crystallin in the absence of stress. *J. Cell Biol.* **120**, 639-645.
- Knauf, U., Bielka, H., and Gaestel, M. (1992) Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett.* **309**, 297-302.
- Knowlton, A.A. (1995) The role of heat shock proteins in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 121-131.
- Kouyama, T. and Mihashi, K. (1981) Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* **114**, 33-38.
- Kramer, A., Schuster, A., Reineke, U., Malin, R., Volkmer Engert, R., Landgraf, C., and Schneider-Mergener, J. (1994) Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: screening tools for the identification of peptides that binds ligands with predefined specificity. *Methods Comp. Methods Enzymol.* **6**, 388-395.
- Kunes, J., Poirier, M., Tremblay, J., and Hamet, P. (1992) Expression of hsp70 gene in lymphocytes from normotensive and hypertensive humans. *Acta Physiol. Scand.* **146**, 307-311.
- Kyhse Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1996a) Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* **18**, 567-577.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1996b) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* **271**, 24313-24316.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamba, O.P., Borchman, D., Sinha, S.K., Shah, J., Renugopalakrishnan, V., and Yappert, M.C. (1993) Estimation of the secondary structure and conformation of bovine lens crystallins by infrared spectroscopy: quantitative analysis and resolution by Fourier self-deconvolution and curve fit. *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 113-123.
- Landry, J., Chretien, P., Lambert, H., Hickey, E., and Weber, L.A. (1989) Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol.* **109**, 7-15.
- Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J.N., Hickey, E., Weber, L.A., and Anderson, C.W. (1992) Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J. Biol. Chem.* **267**, 794-803.
- Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., and Hartl, F.U. (1992) Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J.* **11**, 4757-4765.

- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., and Finch, J.T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**, 416-420.
- Lavoie, J., Chretien, P., and Landry, J. (1990) Sequence of the Chinese hamster small heat shock protein HSP27. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1637
- Lavoie, J.N., Gingras Breton, G., Tanguay, R.M., and Landry, J. (1993a) Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J. Biol. Chem.* **268**, 3420-3429.
- Lavoie, J.N., Hickey, E., Weber, L.A., and Landry, J. (1993b) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* **268**, 24210-24214.
- Lavoie, J.N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L.A., and Landry, J. (1995) Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 505-516.
- Le Breton, E.R. and Carver, J.A. (1996) Solution conformation of bovine lens alpha- and beta-B2- crystallin terminal extensions. *Int. J. Pept. Protein Res.* **47**, 9-19.
- Leach, I.H., Tsang, M.L., Church, R.J., and Lowe, J. (1994) Alpha-B crystallin in the normal human myocardium and cardiac conducting system. *J. Pathol.* **173**, 255-260.
- Lee, G.J., Pokala, N., and Vierling, E. (1995) Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**, 10432-10438.
- Leroux, M.R., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G., and Candido, E.P.M. (1997) Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 24646-24656.
- Li, G.C., Li, L., Liu, Y., Mak, J.Y., Chen, L., and Lee, W.M.F. (1991) Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70 kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1681-1685.
- Li, S., Piotrowicz, R.S., Levin, E.G., Shyy, Y.J., and Chien, S. (1996) Fluid shear stress induces the phosphorylation of small heat shock proteins in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **40**, C994-C1000.
- Liang, P. and MacRae, T.H. (1997) Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **110**, 1431-1440.
- Lipman, D., Altschul, S., and Kececiloglu, J. (1989) A tool for multiple sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 4412-4415.
- Lis, J.T. and Wu, C. (1994) Transcriptional regulation of heat shock genes, in *Transcription: Mechanisms and Regulation* (R.C. Conaway and J.W. Conaway, eds.) Raven Press, Ltd., New York, 459-475.
- Loktionova, S.A., Ilyinskaya, O.P., Gabai, V.L., and Kabakov, A.E. (1996) Distinct effects of heat shock and ATP depletion on distribution and isoform patterns of human Hsp27 in endothelial cells. *FEBS Lett.* **392**, 100-104.
- Longoni, S., James, P., and Chiesi, M. (1990a) Cardiac alpha-crystallin. I. Isolation and identification. *Mol. Cell. Biochem.* **99**, 113-120.
- Longoni, S., Lattonen, S., Bullock, G., and Chiesi, M. (1990b) Cardiac alpha-crystallin. II. Intracellular localization. *Mol. Cell. Biochem.* **97**, 121-128.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.
- Lucchesi, P.A., Bell, J.M., Willis, L.S., Byron, K.L., Corson, M.A., and Berk, B.C. (1996) Ca²⁺ dependent mitogen activated protein kinase activation in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle defines a hypertensive signal transduction phenotype. *Circ. Res.* **78**, 962-970.

- Lutsch, G., Vetter, R., Offhaus, U., Wieske, M., Gröne, H.J., Klemenz, R., Schimke, I., Stahl, J., and Benndorf, R. (1997) Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and alpha-B crystallin in rat and human heart. *Circulation* **96**, 3466-3476.
- Malo, D., Tremblay, J., and Hamet, P. (1988) Genetic and molecular characteristics of thermosensitivity in hypertension. *J. Hypertens. Suppl.* **6**, S55-7.
- Mande, S.C., Mehra, V., Bloom, B.R., and Hol, W.G.J. (1996) Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of mycobacterium leprae. *Science* **271**, 203-207.
- Marber, M.S., Mestrl, R., Chi, S.H., Sayen, M.R., Yellon, D.M., and Dillmann, W.H. (1995) Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.* **95**, 1446-1456.
- Martin, J.L., Mestrl, R., Hilal-Dandan, R., Brunton, L.L., and Dillmann, W.H. (1997) Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* **96**, 4343-4348.
- McGuire, W.L., Dressler, L.G., Sledge, G.W., Jr., Ramzy, I., and Ciocca, D.R. (1986) An estrogen-regulated protein in normal and malignant endometrium. *J. Steroid Biochem.* **24**, 155-159.
- McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., Vanhorn, S., Lee, J.C., Livi, G.P., and Young, P.R. (1996) Identification of mitogen activated protein (MAP) kinase activated protein kinase 3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 8488-8492.
- Mehlen, P., Briolay, J., Smith, L., Diaz Latoud, C., Fabre, N., Pauli, D., and Arrigo, A.P. (1993) Analysis of the resistance to heat and hydrogen peroxide stresses in COS cells transiently expressing wild type or deletion mutants of the *Drosophila* 27-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.* **215**, 277-284.
- Mehlen, P., Mehlen, A., Guillet, D., Preville, X., and Arrigo, A.P. (1995a) Tumor necrosis factor-alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J. Cell. Biochem.* **58**, 248-259.
- Mehlen, P., Preville, X., Chareyron, P., Briolay, J., Klemenz, R., and Arrigo, A.P. (1995b) Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J. Immunol.* **154**, 363-374.
- Mehlen, P. and Arrigo, A.P. (1994) The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization. *Eur. J. Biochem.* **221**, 327-334.
- Meltzer, N.M., Tous, G.I., Gruber, S., and Stein, S. (1987) Gas-phase hydrolysis of proteins and peptides. *Anal. Biochem.* **160**, 356-361.
- Merck, K.B., de Haard Hoekman, W.A., Oude Essink, B.B., Bloemendal, H., and de Jong, W.W. (1992) Expression and aggregation of recombinant alpha A-crystallin and its two domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**, 267-276.
- Merck, K.B., Groenen, P.J., Voorter, C.E., de Haard Hoekman, W.A., Horwitz, J., Bloemendal, H., and de Jong, W.W. (1993) Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**, 1046-1052.
- Mestrl, R., Chi, S.H., Sayen, M.R., O'Reilly, K., and Dillmann, W.H. (1994) Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J. Clin. Invest.* **93**, 759-767.
- Mestrl, R. and Dillmann, W.H. (1995) Heat shock proteins and protection against myocardial ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 45-52.
- Miron, T., Wilchek, M., and Geiger, B. (1988) Characterization of an inhibitor of actin polymerization in vinculin-rich fraction of turkey gizzard smooth muscle. *Eur. J. Biochem.* **178**, 543-553.

- Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M., and Geiger, B. (1991) A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J. Cell Biol.* **114**, 255-261.
- Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C., eds. (1994). *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
- Mullins, J.J., Peters, J., and Ganten, D. (1990) Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* **344**, 541-544.
- Nene, V., Dunne, D.W., Johnson, K.S., Taylor, D.W., and Cordingley, J.S. (1986) Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*: homologies to heat shock proteins and a-crystallins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **21**, 179-188.
- Nover, L., Scharf, K.D., and Neumann, D. (1989) Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1298-1308.
- Oesterreich, S., Benndorf, R., Reichmann, G., and Bielka, H. (1991a) Phosphorylation and acylation of the growth-related murine small heat shock protein p25. *NATO ASI Series* **56**, 489-493.
- Oesterreich, S., Schunck, H., Benndorf, R., and Bielka, H. (1991b) Cisplatin induces the small heat shock protein hsp25 and thermotolerance in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 243-248.
- Oguni, M., Matsui, H., Shinohara, H., Kato, K., and Setogawa, T. (1995) Immunohistochemical and immunochemical localization of heat shock protein 27kD in the developing rat retina - the differential localization from alpha B-crystallin. *Acta Histochem. Cytochem.* **28**, 299-304.
- Ortwerth, B.J. and Olesen, P.R. (1997) Characterization of the elastase inhibition properties of alpha-crystallin and the water-insoluble fraction from bovine lens. *Exp. Eye Res.* **54**, 103-111.
- Pardee, J.D. and Spudich, J.A. (1982) Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.* **85**, 164-181.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 2444-2448.
- Peters, J.M. (1994) Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 377-382.
- Plumier, J.C.L., Ross, B.M., Currie, R.W., Angelidis, C.E., Kazlaris, H., Kollias, G., and Pagoulatos, G.N. (1995) Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J. Clin. Invest.* **95**, 1854-1860.
- Pollard, T.D. (1983) Measurement of rate constants for actin filament elongation in solution. *Anal. Biochem.* **134**, 406-412.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 987-1035.
- Pravenec, M., Sun, Y.L., and Kunes, J. (1991) Environmental susceptibility in hypertension: Potential role of HSP70 and TNFa genes. *J. Vasc. Med. Biol.* **3**, 297-302.
- Rahman, D.R.J., Bentley, N.J., and Tuite, M.F. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* small heat shock protein Hsp26 inhibits actin polymerisation. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 77
- Renkawek, K., de Jong, W.W., Merck, K.B., Frenken, C.W., van Workum, F.P., and Bosman, G.J. (1992) alpha B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol. Berl.* **83**, 324-327.
- Renkawek, K., Bosman, G.J., and de Jong, W.W. (1994a) Expression of small heat-shock protein hsp27 in reactive gliosis in Alzheimer disease and other types of dementia. *Acta Neuropathol. Berl.* **87**, 511-519.
- Renkawek, K., Voorter, C.E., Bosman, G.J., van Workum, F.P., and de Jong, W.W. (1994b) Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Berl.* **87**, 155-160.

- Riabowol, K.T., Mizzen, L.A., and Welch, W.J. (1988) Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* **242**, 433-436.
- Robinson, M.J. and Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 180-186.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonsollamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027-1037.
- Rudolph, R. and Lilie, H. (1996) *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56.
- Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A., and Lindquist, S. (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**, 2357-2364.
- Sanchez, Y. and Lindquist, S.L. (1990) Hsp104 is required for induced thermotolerance. *Science* **248**, 1112-1115.
- Saxton, W. and Frank, J. (1977) Motif detection in quantum noise-limited electron micrographs by cross-correlation. *Ultramicroscopy* **2**, 219-227.
- Schatz, M., Orlova, E.V., Dube, P., Jager, J., and van Heel, M. (1995) Structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin at 30 Å resolution determined using angular reconstitution. *J. Struct. Biol.* **114**, 28-40.
- Serysheva, I.I., Orlova, E.V., Chiu, W., Sherman, M.B., Hamilton, S.L., and van Heel, M. (1995) Electron cryomicroscopy and angular reconstitution used to visualize the skeletal muscle calcium release channel. *Nature Struct. Biol.* **2**, 18-24.
- Sheterline, P., Clayton, J., and Sparrow, J.C. (1995) Actin. *Protein Profile* **2**, 1-103.
- Shinohara, H., Inaguma, Y., Goto, S., Inagaki, T., and Kato, K. (1993) Alpha B-crystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **119**, 203-208.
- Siezen, R.J., Bindels, J.G., and Hoenders, H.J. (1978a) The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Size and charge microheterogeneity: more than 1000 different hybrids? *Eur. J. Biochem.* **91**, 387-396.
- Siezen, R.J., Coenders, F.G., and Hoenders, H.J. (1978b) Three classes of sulfhydryl group in bovine alpha-crystallin according to reactivity to various reagents. *Biochim. Biophys. Acta* **537**, 456-465.
- Siezen, R.J., Bindels, J.G., and Hoenders, H.J. (1980) The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Effects of variation in alkaline pH, ionic strength, temperature and calcium ion concentration. *Eur. J. Biochem.* **111**, 435-444.
- Siezen, R.J. and Argos, P. (1983) Structural homology of lens crystallins. III. Secondary structure estimation from circular dichroism and prediction from amino acid sequences. *Biochim. Biophys. Acta* **748**, 56-67.
- Siezen, R.J. and Bindels, J.G. (1982) Stepwise dissociation/denaturation and reassociation/renaturation of bovine alpha-crystallin in urea and guanidine hydrochloride: sedimentation, fluorescence, near-ultraviolet and far-ultraviolet circular dichroism studies. *Exp. Eye Res.* **34**, 969-983.
- Singh, K., Grothvasselli, B., Kumosinski, T.F., and Farnsworth, P.N. (1995) Alpha-crystallin quaternary structure - molecular basis for its chaperone activity. *FEBS Lett.* **372**, 283-287.
- Sithanandam, G., Latif, F., Smola, U., Bernal, R.A., Duh, F.M., Li, H., Kuzmin, I., Wirier, V., Geil, L., Shresta, S., Lloyd, P.A., Bader, S., Sekido, Y., Tartof, K.D., Kashuba, V.I., Zabarovsky, E.R., Dean, M., Klein, G., Zbar, B., Lerman, M.I., Minna, J.D., Rapp, U.R., and Allikmets, A. (1997) 3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 868-876.
- Smoyer, W.E., Gupta, A., Mundel, P., Ballew, J., D., and Welsh, M.J. (1996) Altered expression of glomerular heat shock protein 27 in experimental nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* **97**, 2697-2704.

- Smulders, R.H.P.H., Carver, J.A., Lindner, R.A., van Boekel, M.A.M., Bloemendal, H., and de Jong, W.W. (1996) Immobilization of the C-terminal extension of bovine alpha-A-crystallin reduces chaperone like activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 29060-29066.
- Spector, A., Li, L.K., Augusteyn, R.C., Schneider, A., and Freund, T. (1971) Alpha-crystallin. The isolation and characterization of distinct macromolecular fractions. *Biochem. J.* **124**, 337-343.
- Stahl, J., Wobus, A.M., Ihrig, S., Lutsch, G., and Bielka, H. (1992) The small heat shock protein hsp25 is accumulated in P19 embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells of line BLC6 during differentiation. *Differentiation* **51**, 33-37.
- Stark, H., Mueller, F., Orlova, E.V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., Zemlin, F., Brimacombe, R., and van Heel, M. (1995) The 70S Escherichia coli ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure* **3**, 815-821.
- Stevens, A., Walsh, R., and Augusteyn, R.C. (1996) A sheet like form of alpha crystallin. *Curr. Eye Res.* **15**, 215-218.
- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P., and Gaestel, M. (1992) Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **313**, 307-313.
- Stokoe, D., Caudwell, B., Cohen, P.T.W., and Cohen, P. (1993) The substrate specificity and structure of mitogen- activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2. *Biochem. J.* **296**, 843-849.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., and Chapman, D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. *Biochemistry* **32**, 389-394.
- Surewicz, W.K. and Olesen, P.R. (1995) On the thermal stability of alpha-crystallin - a new insight from infrared spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 9655-9660.
- Suzuki, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Ichikawa, H., Shirakura, R., and Matsuda, H. (1997) In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia reperfusion injury in rat. *J. Clin. Invest.* **99**, 1645-1650.
- Takemoto, L., Emmons, T., and Horwitz, J. (1993) The C-terminal region of alpha-crystallin: involvement in protection against heat-induced denaturation. *Biochem. J.* **294**, 435-438.
- Thomas, P.J., Qu, B.H., and Pedersen, P.L. (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 456-459.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**, 389-398.
- Ungar, D.R., Hailat, N., Strahler, J.R., Kuick, R.D., Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Reynolds, C.P., and Hanash, S.M. (1994) Hsp27 expression in neuroblastoma - correlation with disease stage. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 780-784.
- van den Oetelaar, P.J., van Someren, P.F., Thomson, J.A., Siezen, R.J., and Hoenders, H.J. (1990) A dynamic quaternary structure of bovine alpha-crystallin as indicated from intermolecular exchange of subunits. *Biochemistry* **29**, 3488-3493.
- van Heel, M. (1984) Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy* **13**, 165-183.
- van Heel, M., Schatz, M., and Orlova, E.V. (1992) Correlation functions revisited. *Ultramicroscopy* **46**, 304-316.
- van Heel, M. and Frank, J. (1981) Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy* **6**, 187-194.

- van Noort, J.M., van Sechel, A.C., Bajramovic, J.J., El Ouagmiri, M., Polman, C.H., Lassmann, H., and Ravid, R. (1995) The small heat-shock protein alpha-B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* **375**, 798-801.
- Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 579-620.
- Voorter, C.E., de Haard Hoekman, W.A., Roersma, E.S., Meyer, H.E., Bloemendal, H., and de Jong, W.W. (1989) The in vivo phosphorylation sites of bovine alpha B-crystallin. *FEBS Lett.* **259**, 50-52.
- Wagstaff, M.J.D., Collaco-Moraes, Y., Aspey, B.S., Coffin, R.S., Harrison, M.J.G., Latchman, D.S., and de Belleruche, J.S. (1996) Focal cerebral ischaemia increases the levels of several classes of heat shock proteins and their corresponding mRNAs. *Mol. Brain Res.* **42**, 236-244.
- Waldmann, T., Nimmesgern, E., Nitsch, M., Peters, J., Pfeifer, G., Muller, S., Kellermann, J., Engel, A., Hartl, F.U., and Baumeister, W. (1995) The thermosome of *Thermoplasma acidophilum* and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC. *Eur. J. Biochem.* **227**, 848-856.
- Walsh, M.T., Sen, A.C., and Chakrabarti, B. (1991) Micellar subunit assembly in a three-layer model of oligomeric alpha-crystallin. *J. Biol Chem.* **266**, 20079-20084.
- Wang, K.Y., Ma, W.C., and Spector, A. (1995) Phosphorylation of alpha-crystallin in rat lenses is stimulated by H₂O₂ but phosphorylation has no effect on chaperone activity. *Exp. Eye Res.* **61**, 115-124.
- Waskiewicz, A.J. and Cooper, J.A. (1995) Mitogen and stress response pathways - MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 798-805.
- Waters, E.R., Lee, G.J., and Vierling, E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**, 325-338.
- Welch, W.J. (1985) Phorbol ester, calcium ionophore, or serum added to quiescent rat embryo fibroblast cells all result in the elevated phosphorylation of two 28,000-dalton mammalian stress proteins. *J. Biol Chem.* **260**, 3058-3062.
- Welch, W.J. and Suhan, J.P. (1985) Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol.* **101**, 1198-1211.
- Welsh, M.J., Wu, W., Parvinen, M., and Gilmont, R.R. (1996) Variation in expression of hsp27 messenger ribonucleic acid during the cycle of the seminiferous epithelium and co-localization of hsp27 and microfilaments in Sertoli cells of the rat. *Biol. Reprod.* **55**, 141-151.
- Wistow, G. (1985) Domain structure and evolution in alpha-crystallins and small heat-shock proteins. *FEBS Lett.* **181**, 1-6.
- Wistow, G. (1993) Possible tetramer-based quarternary structures for alpha-crystallins and small heat shock proteins. *Exp. Eye Res.* **56**, 729-732.
- Wistow, G.J. and Piatigorsky, J. (1988) Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 479-504.
- Wollgiehn, R., Neumann, D., Zurnieden, U., Musch, A., Scharf, K.D., and Nover, L. (1994) Intracellular distribution of small heat stress proteins in cultured cells of *Lycopersicon peruvianum*. *J. Plant Physiol.* **144**, 491-499.
- Wotton, D., Freeman, K., and Shore, D. (1996) Multimerization of hsp42p, a novel heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is dependent on a conserved carboxyl-terminal sequence. *J. Biol. Chem.* **271**, 2717-2723.
- Yokote, Y., Murayama, A., and Akahane, K. (1986) Recovery of tryptophan from 25-minute acid hydrolysates of protein. *Anal. Biochem.* **152**, 245-249.

-
- Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Kumagai, H., Yahara, I., and Sakai, H. (1991) Inhibition of actin polymerization by a synthetic dodecapeptide patterned on the sequence around the actin-binding site of cofilin. *J. Biol. Chem.* **266**, 10485-10489.
- Yost, H.J., Petersen, R.B., and Lindquist, S. (1990) Posttranslational regulation of heat shock protein synthesis in *Drosophila*, in *Stress Proteins in Biology and Medicine* (Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C., eds.), Cold Spring Harbour, New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 379-409.
- Zanema, A., Verlaan de Fries, M., Maasdam, D., Bol, S., and van der Eb, A. (1992) Heat shock protein 27 and alpha-B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock. *J. Biol. Chem.* **267**, 12936-12941.
- Zhu, Y., O'Neill, S., Saklatvala, J., Tassi, L., and Mendelsohn, M.E. (1994) Phosphorylated HSP27 associates with the activation-dependent cytoskeleton in human platelets. *Blood* **84**, 3715-3723.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1:	FPLC-Chromatogramme der Aufreinigungsschritte des nativen HSP25	26
Abb. 3.2:	Proteinmuster der Proben und Nachweis von HSP25 nach den einzelnen Reinigungsschritten	27
Abb. 3.3:	Elektronenmikroskopische Darstellung von nativem HSP25	29
Abb. 3.4:	Ergebnisse der Strukturanalyse der negativ kontrastierten HSP25-Komplexe	29
Abb. 3.5:	Grafiken zur Bestimmung der Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten	30
Abb. 3.6:	Strukturmodell für die aus EAT-Zellen aufgereinigten HSP25-Komplexe	32
Abb. 3.7:	Elektronenmikroskopische Darstellung von rekombinantem murinem HSP25	34
Abb. 3.8:	Elektronenmikroskopische Darstellung von rekombinantem menschlichem HSP25	35
Abb. 3.9:	Hemmung der Actinpolymerisation durch kHSPs und HSP25-Mutanten	37
Abb. 3.10:	Einfluß von HSP25 Peptid 6 und 11 auf die Actinpolymerisation	39
Abb. 3.11:	Darstellung des Einflusses von HSP25 Peptid 11 auf die Actinpolymerisation mittels Elektronenmikroskopie	40
Abb. 3.12:	Einfluß verschiedener Peptid 11-Abkömmlinge auf die Actinpolymerisation	42
Abb. 3.13:	Vergleich der Sequenzen von Maus-, Mensch- und Huhn-HSP25 sowie von Maus- α B-Crystallin	43
Abb. 3.14:	Konzentrationsverteilungskurven von Actin und Peptid 11	46
Abb. 3.15:	Nachweis von HSP25 nach der Inkubation auf der Actin-Membran	47
Abb. 3.16:	Nachweis von HSP25 in Gewebeproben von normotonen (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHRSP)	48
Abb. 3.17:	Nachweis von HSP25 und HSP70 in Gewebeproben von normotonen (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHRSP)	49
Abb. 3.18:	Nachweis von HSP25 in linken (l.) und rechten (r.) Ventrikeln von Goldblatt-operierten (2K1C) und scheinoperierten Sprague-Dawley-Ratten (SD) nach verschiedenen Zeiten	51
Abb. 3.19:	Nachweis von HSP25 und HSP70 in Gewebeproben von Goldblatt-operierten (2K1C) und scheinoperierten Sprague-Dawley-Ratten (SD)	52
Abb. 3.20:	Nachweis von HSP25 und HSP70 in Ventrikeln von TGR(mREN2)27- und Sprague-Dawley-Ratten (SD)	53
Abb. 4.1:	Struktur von monomerem Actin	65
Abb. 4.2:	Modell der Struktur-Funktionsbeziehungen von HSP25	69

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Aufreinigungsschritte bei der Actin-Präparation	14
Tab. 2.2:	Pipettierschema für 10 SDS-Gradientengele bzw. 2 Sammelgele	17
Tab. 3.1:	Bilanz einer repräsentativen HSP25-Präparation	27
Tab. 3.2:	Statistische Auswertung der Partikelgrößen von HSP25-Wildtyp und -Mutanten	36
Tab. 3.3:	Peptid-Bibliothek der HSP25-Sequenz	38
Tab. 3.4:	Vergleich der vom Maus HSP25 Peptid 11 abgeleiteten Sequenzen	41
Tab. 3.5:	Hydrodynamische Parameter einiger HSP25-Peptide	45
Tab. 3.6:	Sequenzen der mit HSP25 wechselwirkenden Actin-Peptide	47
Tab. 3.7:	Gehalt an HSP25 und HSP70 in Gewebeproben von normotonen (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHRSP)	50
Tab. 3.8:	Gehalt an HSP25 und HSP70 in Gewebeproben von Goldblatt-operierten (2K1C) und scheinoperierten Sprague-Dawley-Ratten (SD)	52
Tab. 3.9:	Tier- und Herzgewichte von TGR(mREN2)27- und Sprague-Dawley-Ratten (SD)	54
Tab. 3.10:	Gehalt an HSP25 und HSP70 in Ventrikeln von TGR(mREN2)27 und Sprague-Dawley- Ratten (SD)	54
Tab. 3.11:	Relative Unterschiede im HSP-Gehalt von Herzgewebe und Aorta zwischen normotonen und hypertonen Ratten der drei Hypertonie-Modelle	55
Tab. 7.1:	Abkürzungen der Aminosäuren	92
Tab. 7.2:	Sequenzen der Zellulose-gebundenen HSP25-Peptid-Bibliothek (HSP25 der Maus)	92
Tab. 7.3:	Sequenzen der Zellulose-gebundenen Actin-Peptid-Bibliothek (humanes α -Skelettmuskel-Actin)	93

7.3 Abkürzungen

AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumine (<i>bovine serum albumine</i>)
β-ME	β-Mercaptoethanol
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
DEAE	Dimethylaminoethyl
DTT	Dithiothreitol
DTE	1,4-Dithioerythrit
dpi	Pixel pro inch (<i>dots per inch</i>)
EAT	Ehrlich-Ascites-Tumor
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ERK	durch extrazelluläre Signale regulierte Proteinkinase
F-Actin	fibrilläres Actin
FPLC	Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie (<i>fast pressure liquid chromatography</i>)
G-Actin	globuläres Actin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSE	Hitzeschockelement
HSP	Hitzeschockprotein
kHSPs	kleine Hitzeschockproteine
kDa	kilo-Dalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAPK	Mitogen-aktivierte- Proteinkinase aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MKK	MAPK-Kinase
Mr	Molekulargewicht
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSA	Multivariate Statistische Analyse
PBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PKC	Proteinkinase C
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP2A/B	Proteinphosphatase 2A/B
PVDF	Polyvinylidifluorid
s	Sekunde
SD	Sprague-Dawley-Ratten
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SH3	src-Homologie 3
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
WKY	Wistar-Kyoto-Ratten

Tab. 7.1: Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Tab. 7.2: Sequenzen der Zellulose-gebundenen HSP25-Peptid-Bibliothek (HSP25 der Maus)

Nr.	Sequenz	Nr.	Sequenz	Nr.	Sequenz	Nr.	Sequenz
1	MTERRVPFSLRLS	26	GWPGYVRPLPAAT	51	VSLDVNHFAPEEL	76	GVDPTLVSSSLSP
2	ERRVPFSLRLSPS	27	PGYVRPLPAATAE	52	LDVNHFAPEELTV	77	DPTLVSSSLSPEG
3	RVPFSLRLSPSWE	28	YVRPLPAATAEGP	53	VNHFAPEELTVKT	78	TLVSSSLSPEGTL
4	PFSLRLSPSWEPF	29	RPLPAATAEGPAA	54	HFAPEELTVKTKE	79	VSSSLSPEGTLTV
5	SLLRSPSWEPRD	30	LPAATAEGPAAVT	55	APEELTVKTKEGV	80	SSLSPEGTLTVEA
6	LRSPSWEPRDWDY	31	AATAEGPAAVTLA	56	EELTVKTKEGVVE	81	LSPEGTLTVEAPL
7	SPSWEPRDWDYPA	32	TAEGPAAVTLAAP	57	LTVKTKEGVVEIT	82	PEGTLTVEAPLPK
8	SWEPRDWDYPAHS	33	EGPAAVTLAAPAF	58	VKTKEGVVEITGK	83	GTTLTVEAPLPKAV
9	EPFRDWDYPAHSRL	34	PAAVTLAAPAFSR	59	TKEGVVEITGKHE	84	LTVEAPLPKAVTQ
10	FRDWDYPAHSRLFD	35	AVTLAAPAFSRAL	60	EGVVEITGKHEER	85	VEAPLPKAVTQSA
11	DWYPAHSRLFDQA	36	TLAAPAFSRALNR	61	VVEITGKHEERQD	86	APLPKAVTQSAEI
12	YPAHSRLFDQAFG	37	AAPAFSRALNRQL	62	EITGKHEERQDEH	87	LPKAVTQSAEITI
13	AHSRLFDQAFGVP	38	PAFSRALNRQLSS	63	TGKHEERQDEHGY	88	KAVTQSAEITIPV
14	SRLFDQAFGVPR	39	FSRALNRQLSSGV	64	KHEERQDEHGYIS	89	VTQSAEITIPVTF
15	LFDQAFGVPRLPD	40	RALNRQLSSGVSE	65	EERQDEHGYISRC	90	QSAEITIPVTFEA
16	DQAFGVPRLPDEW	41	LNRLSSGVSEIR	66	RQDEHGYISRCFT	91	AEITIPVTFEARA
17	AFGVPRLPDEWSQ	42	RQLSSGVSEIRQT	67	DEHGYISRCFTRK	92	ITIPVTFEARAQI
18	GVPRLPDEWSQWF	43	LSSGVSEIRQTAD	68	HGYISRCFTRKYT	93	IPVTFEARAQIGG
19	PRLPDEWSQWFSA	44	SGVSEIRQTADRW	69	YISRCFTRKYTLP	94	VTFEARAQIGGPE
20	LPDEWSQWFSAAG	45	VSEIRQTADRWRV	70	SRCFTRKYTLPPG	95	FEARAQIGGPEAG
21	DEWSQWFSAAGWP	46	EIRQTADRWRVSL	71	CFTRKYTLPPGVD	96	ARAQIGGPEAGKS
22	WSQWFSAAGWPGY	47	RQTADRWRVSLDV	72	TRKYTLPPGVDPT	97	AQIGGPEAGKSEQ
23	QWFSAAGWPGYVR	48	TADRWRVSLDVNH	73	KYTLPPGVDPTLV	98	IGGPEAGKSEQSG
24	FSAAGWPGYVRPL	49	DRWRVSLDVNHFA	74	TLPPGVDPTLVSS	99	GPEAGKSEQSGAK
25	AAGWPGYVRPLPA	50	WRVSLDVNHFAPE	75	PPGVDPTLVSSSL		

Tab. 7.3: Sequenzen der Zellulose-gebundenen Actin-Peptid-Bibliothek (humanes α -Skelettmuskel-Actin)

Nr.	Sequenz	Nr.	Sequenz	Nr.	Sequenz	Nr.	Sequenz
1	DEDETTALVCDNG	47	ELRVAPEEHPTLL	93	LTDYLMKILTERG	139	TTYNSIMKCDIDI
2	DETTALVCDNGSG	48	RVAPEEHPTLLTE	94	DYLMKILTERGYS	140	YNSIMKCDIDIRK
3	TTALVCDNGSGLV	49	APEEHPTLLTEAP	95	LMKILTERGYSFV	141	SIMKCDIDIRKDL
4	ALVCDNGSGLVKA	50	EEHPTLLTEAPLN	96	KILTERGYSFVTT	142	MKCDIDIRKDLYA
5	VCDNGSGLVKAGF	51	HPTLLTEAPLNPK	97	LTERGYSFVTAE	143	CDIDIRKDLYANN
6	DNGSGLVKAGFAG	52	TLLTEAPLNPKAN	98	ERGYSFVTTAERE	144	IDIRKDLYANNVM
7	GSGLVKAGFAGDD	53	LTEAPLNPKANRE	99	GYSFVTTAEREIV	145	IRKDLYANNVMSG
8	GLVKAGFAGDDAP	54	EAPLNPKANREKM	100	SFVTTAEREIVRD	146	KDLYANNVMSGGT
9	VKAGFAGDDAPRA	55	PLNPKANREKMTQ	101	VTTAEREIVRDIK	147	LYANNVMSGGTTM
10	AGFAGDDAPRAVF	56	NPKANREKMTQIM	102	TAEREIVRDIKEK	148	ANNVMSGGTTMYP
11	FAGDDAPRAVFPS	57	KANREKMTQIMFE	103	EREIVRDIKEKLC	149	NVMSGGTTMYPGI
12	GDDAPRAVFPSIV	58	NREKMTQIMFETF	104	EIVRDIKEKLCYV	150	MSGGTTMYPGIAD
13	DAPRAVFPSIVGR	59	EKMTQIMFETFNV	105	VRDIKEKLCYVAL	151	GGTTMYPGIADRM
14	PRAVFPSIVGRPR	60	MTQIMFETFNVPA	106	DIKEKLCYVALDF	152	TTMYPGIADRMQK
15	AVFPSIVGRPRHQ	61	QIMFETFNVPAKY	107	KEKLCYVALDFEN	153	MYPGIADRMQKEI
16	FPSIVGRPRHQGV	62	MFETFNVPAKYVA	108	KLCYVALDFENEM	154	PGIADRMQKEITA
17	SIVGRPRHQGVVM	63	ETFNVPAKYVAIQ	109	CYVALDFENEMAT	155	IADRMQKEITALA
18	VGRPRHQGVVMGM	64	FNVPAKYVAIQAV	110	VALDFENEMATAA	156	DRMQKEITALAPS
19	RPRHQGVVMGMGQ	65	VPAMYVAIQAVLS	111	LDNFENEMATAASS	157	MQKEITALAPSTM
20	RHQGVVMGMGQKD	66	AMYVAIQAVLSLY	112	FENEMATAASSSS	158	KEITALAPSTMKI
21	QGVMVMGMGQKDSY	67	YVAIQAVLSLYAS	113	NEMATAASSSSSLE	159	ITALAPSTMKIKI
22	VMVMGMGQKDSYVG	68	AIQAVLSLYASGR	114	MATAASSSSSLEKS	160	ALAPSTMKIKIIA
23	VGMGMGQKDSYVGDE	69	QAVLSLYASGRTT	115	TAASSSSSLEKSYE	161	APSTMKIKIIAPP
24	MGQKDSYVGDEAQ	70	VLSLYASGRTTGI	116	ASSSSSLEKSYELP	162	STMKIKIIAPPER
25	QKDSYVGDEAQSK	71	SLYASGRTTGIVL	117	SSSLEKSYELPDG	163	MKIKIIAPPERKY
26	DSYVGDEAQSKRG	72	YASGRTTGIVLDS	118	SLEKSYELPDGQV	164	IKIIAPPERKYSV
27	YVGDEAQSKRGIL	73	SGRTTGIVLDSGD	119	EKSYELPDGQVIT	165	IIAPPERKYSVWI
28	GDEAQSKRGILTTL	74	RTTGIVLDSGDGV	120	SYELPDGQVITIG	166	APPERKYSVWIGG
29	EAQSKRGILTTLKY	75	TGIVLDSGDGVTH	121	ELPDGQVITIGNE	167	PERKYSVWIGGSI
30	QSKRGILTTLKYPI	76	IVLDSGDGVTHNV	122	PDGQVITIGNERF	168	RKYSVWIGGSILA
31	KRGILTTLKYPIEH	77	LDSDGDGVTHNVPI	123	GQVITIGNERFRC	169	YSVWIGGSILASL
32	GILTTLKYPIEHGI	78	SGDGVTHNVPIYE	124	VITIGNERFRCPE	170	VWIGGSILASLST
33	LTLKYPIEHGIIT	79	DGVTHNVPIYEGY	125	TIGNERFRCPETL	171	IGGSILASLSTFQ
34	LKYPIEHGIITNW	80	VTHNVPIYEGYAL	126	GNFRFRCPETLFQ	172	GSILASLSTFQQM
35	YPIEHGIITNWDD	81	HNVPYIYEGYALPH	127	ERFRCPETLFQPS	173	ILASLSTFQQMWI
36	IEHGIITNWDDME	82	VPIYEGYALPHAI	128	FRCPETLFQPSFI	174	ASLSTFQQMWITK
37	HGIITNWDDMEKI	83	IYEGYALPHAIMR	129	CPETLFQPSFIGM	175	LSTFQQMWITKQE
38	IITNWDDMEKIWH	84	EGYALPHAIMRLD	130	ETLFQPSFIGMES	176	TFQQMWITKQEYD
39	TNWDDMEKIWHHT	85	YALPHAIMRLDLA	131	LFQPSFIGMESAG	177	QQMWITKQEYDEA
40	WDDMEKIWHHTFY	86	LPHAIMRLDLAGR	132	QPSFIGMESAGIH	178	MWITKQEYDEAGP
41	DMEKIWHHTFYNE	87	HAIMRLDLAGRDL	133	SFIGMESAGIHET	179	ITKQEYDEAGPSI
42	EKIWHHTFYNELR	88	IMRLDLAGRDLTD	134	IGMESAGIHETTY	180	KQEYDEAGPSIVH
43	IWHHTFYNELRVA	89	RLDLAGRDLTDYL	135	MESAGIHETTYNS	181	EYDEAGPSIVHRK
44	HHTFYNELRVAP	90	DLAGRDLTDYLMK	136	SAGIHETTYNSIM	182	DEAGPSIVHRKCF
45	TFYNELRVAPPEH	91	AGRDLTDYLMKIL	137	GIHETTYNSIMKC		
46	YNELRVAPPEHPT	92	RDLTDYLMKILTE	138	HETTYNSIMKCDI		

7.4 Eigene Veröffentlichungen

Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., and Lutsch, G. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 20780-20784.

Behlke, J., Dube, P., van Heel, M., Wieske, M., Hayess, K., Benndorf, R., and Lutsch, G. (1995) Supramolecular structure of the small heat shock protein Hsp25. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **99**, 87-93.

Lutsch, G., Vetter, R., Offhauss, U., Wieske, M., Gröne, H.J., Klemenz, R., Schimke, I., Stahl, J., and Benndorf, R. (1997) Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and alpha-B crystallin in rat and human heart. *Circulation* **96**, 3466-3476.

Dube, P., Wieske, M., Stark, H., Schatz, M., Stahl J., Zemlin, F., Lutsch, G. and van Heel, M. (1998) The rat-liver 80S ribosome at 25Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *Structure* **6**, 389-399.

Wieske, M., Benndorf, R., Behlke, J., Dölling, R., Grelle, G., Bielka, H., and Lutsch, G.. Polypeptide motifs of the small heat shock protein HSP25 involved in inhibition of actin polymerization. In Vorbereitung.

Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., and Gaestel, M.. Regulation of Hsp25 oligomerization, chaperone function and protective activity against oxidative stress/TNF α by phosphorylation. In Vorbereitung.

7.5 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. G. Lutsch und Herrn Prof. Dr. J. Behlke für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema arbeiten zu können. Frau Dr. G. Lutsch danke ich insbesondere für die intensive Betreuung, die stete Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei der elektronenmikroskopischen Arbeit. Herrn Prof. Dr. J. Behlke danke ich besonders für die Möglichkeit, die ganze Zeit in seinem Labor arbeiten zu können, für die Hilfe bei dem Umgang mit der analytischen Ultrazentrifuge und die vielen Messungen und Berechnungen mit meinen Proben. Für die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen und dem Interesse am Fortgang meiner Arbeit danke ich beiden gleichermaßen.

Herrn Prof. Dr. M. Gaestel und der ganzen Arbeitsgruppe Streßproteine danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die Bereitstellung der rekombinanten Proteine. Besonders danke ich Herrn Dr. R. Benndorf, Frau U. Gerhard und Frau M. Schmidt für die gute Zusammenarbeit und Katrin Hayeß für die unkomplizierte Hilfestellung bei vielen biochemischen Fragestellungen. Herrn Dr. J. Stahl danke ich für die Unterstützung aus seinem Labor und dafür, daß er immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Elektronenmikroskopie und AG Proteininteraktionen für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche Unterstützung. Besonderer Dank gebührt Frau B. Bödner und Frau E. Kotitschke für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Arbeiten im Labor.

Für die gute Zusammenarbeit bei dem 'Ribosomen-Projekt' bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. van Heel, Herrn Dr. R. Brimacombe, Dr. Holger Stark und Dr. Michael Schatz. Insbesondere danke ich Dr. Prakash Dube für die gemeinsamen Stunden am Elektronenmikroskop und die intensiven Gespräche und Herrn Dr. Fritz Zemlin danke ich schon jetzt für die hoffentlich erfolgreiche Zusammenarbeit in der Zukunft.

Ich bedanke mich bei allen Kooperationspartnern in und außerhalb des MDC, die an der Entstehung der Arbeit beteiligt waren. Herrn Prof. Dr. H. Welfle für die Meßmöglichkeit am Fluoreszenzspektrometer und Herrn Dr. R. Misselwitz und Frau B. Kannen für die stete Hilfsbereitschaft an diesem Gerät. Der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. B. Wittmann-Liebold für die Mitbenutzung diverser Geräte und Frau Gerlinde Grelle für die stets prompten Konzentrationsbestimmungen der Peptide. Dem Team der Bildverarbeitung für die Hilfsbereitschaft in allen Bereichen der Rechentechnik und graphischen Darstellung. Herrn Dr. H. Haller sowie Dr. Andrea Weis und Dr. Duzka Dragun für die Hilfe bei der Besorgung und Verarbeitung der Gewebeproben. Dr. Sergei Ryazantsev aus Pushchino für die fruchtbare Zusammenarbeit während seines Aufenthaltes in Berlin. Frau Dr. Piossek (Fa. Jerini BioTools GmbH, Berlin) und Herrn Dr. R. Dölling (Fa. BioTeZ, Berlin) habe ich für Ihre Kooperationsbereitschaft zu danken.

Vielen Dank an Birgit für die kritische Unterstützung dieser Arbeit und für ihre Geduld mit mir. Moritz danke ich für viele neue Perspektiven und die Ablenkung.

7.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Berlin, den 26. März 1998

.....
Martin Wieseke

7.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname:	Martin Wieske
geboren am:	12.11.1963 in Leeden/Nordrhein-Westfalen
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind
Konfession:	evangelisch
Wohnort:	Finowstr. 7, 16321 Bernau

Schulausbildung

Aug. 1970 bis Jul. 1974	Besuch der Grundschule Leeden
Aug. 1974 bis Mai 1983	Besuch des Städt. Gymnasiums Lengerich/Westf
Mai 1983	Abitur

Berufsausbildung und berufliche Tätigkeit

Aug. 1983 bis Jan. 1986	Ausbildung zum Modelltischler bei der Fa. Windmöller & Hölscher in Lengerich/Westf.
Jan. 1986 bis Sep. 1986	Beschäftigung als Modelltischler bei der Fa. Windmöller & Hölscher in Lengerich/Westf.

Wissenschaftliche Ausbildung

Okt. 1986 bis Okt. 1992	Studium der Biologie an der Westfälischen-Wilhelms- Universität Münster
Okt. 1991 bis Okt. 1992	Diplomand am Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Abteilung Populations- und Chronobiologie, der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster
Okt. 1992	Diplom Biologie
Jan. 1993 bis März 1998	Doktorand am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch, Abteilung Elektronenmikroskopie